



TITLE:

粘菌Dictyostelium discoideumの細胞の分化過程における遺伝子の発現制御機構の解析(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

森尾, 貴広

CITATION:

森尾, 貴広. 粘菌Dictyostelium discoideumの細胞の分化過程における遺伝子の発現制御機構の解析. 京都大学, 1994, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1994-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3075822>

RIGHT:

②
主論文

粘菌 *Dictyostelium discoideum* の細胞の分化過程に
おける遺伝子の発現制御機構の解析

京都大学理学研究科植物学教室

森尾貴広

目次

要旨	3
第1章 序論	4
第2章 材料と方法	9
第3章 細胞型特異的な遺伝子の発現調節様式の解析	
研究の背景	19
結果	20
第4章 Dp87遺伝子の予定孢子細胞特異的な転写調節機構	
の解析	
研究の背景	26
結果	32
第5章 結論と考察	59
謝辞	69
参考文献	70

要旨

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、孢子から発芽後アメーバ状の単細胞生物として大腸菌などのバクテリアを餌に、細胞分裂によって増殖する。餌がなくなると集合して多細胞体となり、その中で細胞分化・パターン形成をおこない、最終的に柄と孢子からなる子実体を形成する。本研究ではこの生物における細胞分化の調節機構を理解することを目的として、分化した細胞で特異的に発現する遺伝子の発現調節機構の解析を行なった。まず、すでにクローン化されているいくつかの細胞型特異的な遺伝子の発現が、転写レベルで調節されているかどうかを単離細胞核を用いた run-on assay によって明らかにした。その結果、mRNA の細胞型特異的発現には主として転写レベルでの調節が関与するものと転写後の調節が関与するものの2種類が存在することが示された。また、この実験結果はこれまで調べられた遺伝子の中で、Dp87 遺伝子が発生過程で最も早く転写を開始する予定孢子細胞に特異的な遺伝子であることを示した。このことはこの遺伝子の転写調節機構を解明することが、予定孢子細胞の分化の機構を理解する上で非常に重要であることを示唆している。Dp87 遺伝子の転写調節に関与するシス領域の解析においては、この遺伝子の転写が、(1) 予定孢子細胞において正の調節を行なう領域、(2) 増殖期の細胞および分化した予定柄細胞において負の調節を行う領域、(3) 増殖期・発生過程を通じて正の調節をおこなう領域、(4) TATA box および転写開始点を含み上記の調節領域が正常に機能するために必要な領域、の機能の異なる4つの調節領域の協調作用により調節されることを明らかにした。さらにこれらの領域の中の予定孢子細胞特異的な正の調節領域に塩基配列特異的に結合する核内タンパク質因子の解析およびその部分精製を行なった。

第1章 序論

多細胞生物の発生過程において細胞は増殖すると共に異なった性質を持つ細胞に分化する。それぞれの分化した細胞は組織の中で定まった場所に一定の割合で存在することで組織特有のパターンを形成し、さらに個体全体としてそれぞれの生物種を特徴づける形態を形成する。すなわち、生物の発生現象は細胞の増殖・分化・パターン形成および形態形成の一連の過程として捉えることができる。こうした一連の過程が正しく進行するためには、多くの遺伝子が時間的・空間的に秩序だって発現、機能することが必要不可欠である。従って、これらの過程において遺伝子の発現がどのように制御されるのか、また発現した遺伝子がどのように機能するかを解明することは、発生現象を理解する上で非常に重要である。このため、様々な生物を材料として発生現象に関連する遺伝子の発現調節機構の解析が近年精力的に行われている。とりわけ多くの系で分化した細胞に特異的な遺伝子の発現が分化過程でどのように調節されているかについて研究されている。本研究は、細胞性粘菌を材料に分化した細胞に特異的に発現する遺伝子の発現調節機構の解明を目的として行なった。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、孢子から発芽後、アメーバ状の単細胞生物として大腸菌などのバクテリアを餌に細胞分裂によって増殖する（図1 A-a）。餌が無くなると個々の細胞が集合し半球状の多細胞体を形成する（図1 A-b～d）。その後、多細胞体の頭頂部に乳頭状突起が現れこれが伸長して細長いなめくじ状の組織になる（図1 A-e）。この組織は通常の条件下では基質面に倒れ込み、基質上を這うように移動する（図1 A-f；移動体）。そして適当な環境まで移動した後、一連の形態形成過程を経て最終的に細胞壁を持ち液胞化した柄細胞と孢子からなる子実体に変化する（図1 A-g～i）。この過程において、子実体における柄細胞と孢子それぞれの前駆体に当たる予定柄細胞と予定孢子細胞が多細胞体形成後に分化する。また、分化した両予定細胞は、移動体において前後に分布し、その割合は移

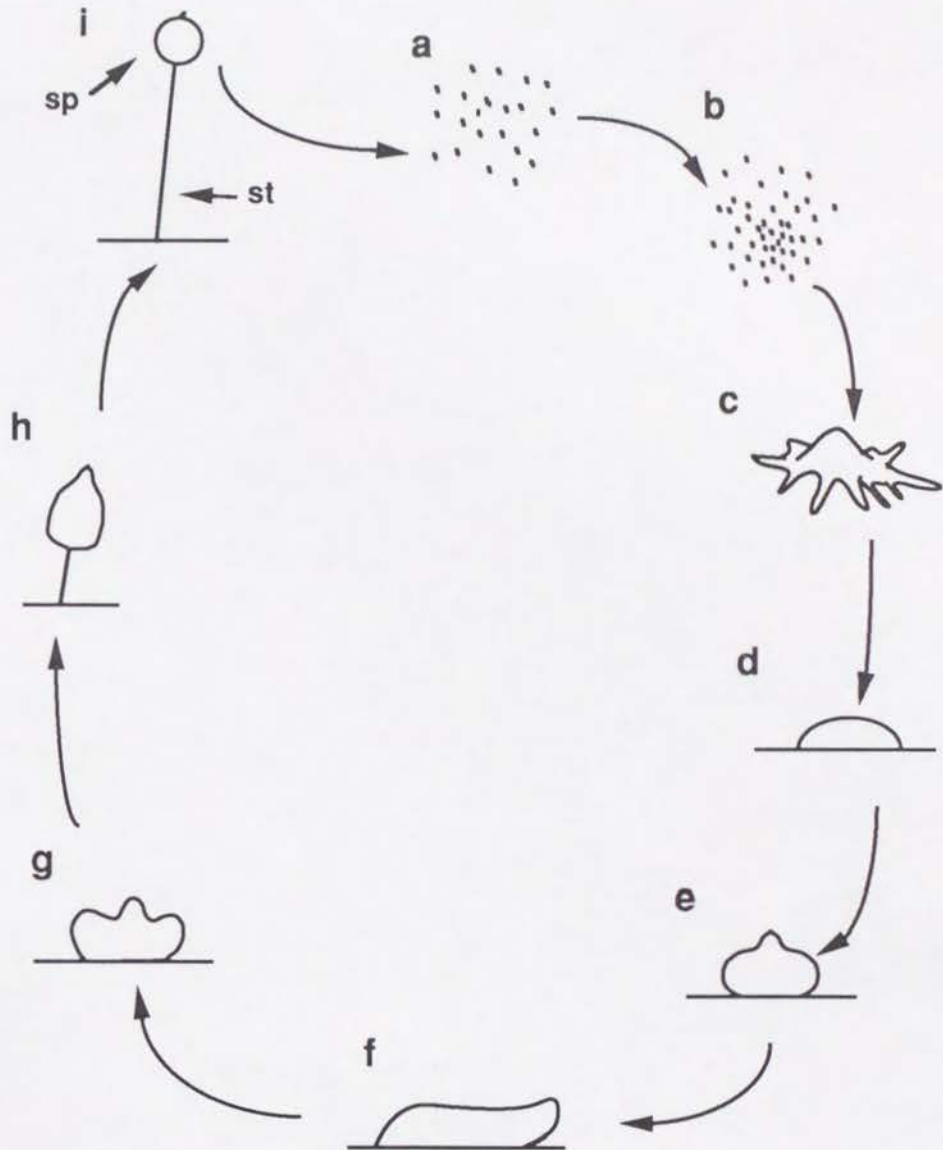
動物体の大きさにかかわらず一定であり、しかも細胞の分化は子実体形成過程まで可逆的に調節可能である（図1B）。この生物では細胞の増殖と発生を切り放せること、わずか2種類の細胞型に分化すること、および分化した細胞が多細胞体の中で一定のパターンをとり、しかもこのパターンが調節可能であることなどの理由から、その発生系は多細胞生物の発生過程における細胞の分化やパターン形成の機構を解析するためのよい実験材料として長年にわたって研究されている（Loomis, 1982）。また、近年においては遺伝子のクローニングと外来遺伝子の導入およびそれを用いた内在の遺伝子破壊などの分子遺伝学的手法が確立され、分子レベルでの解析が進められている（Nellen et al., 1984; De Lozanne and Spudich, 1987; Howard et al., 1988）。

この生物において、細胞が分化する過程で遺伝子の発現がどのように調節されているかを解明するために、予定胞子細胞あるいは予定柄細胞に特異的に発現するmRNAに対応するcDNAクローンおよび遺伝子が多数単離され、その発現調節機構の解析が進められている（Barklis and Lodish, 1983; Mehdy et al., 1983; Ceccarelli et al., 1987; Jermyn et al., 1987; Williams et al., 1987; Corney et al., 1990; Fosnaugh and Loomis, 1991）。それらの研究の一つとして、尾崎らは多細胞体より分離した予定柄細胞並びに予定胞子細胞から得たpoly (A⁺) RNAをプローブに用いてそれぞれの細胞型に特異的に存在するmRNAに対応するcDNAクローンおよびそれをコードする遺伝子のクローンをいくつか単離した（Ozaki et al., 1988）。尾崎らによって得られた細胞型特異的なcDNAクローンはその発現パターンから以下の3つのグループに分類される（図2）。第1のグループには、そのmRNAが増殖期より発生過程を通じて存在し移動体においては予定胞子細胞に特異的に存在する遺伝子で、Dp28、Dp34遺伝子やタンパク質伸長因子をコードしているDdEF2遺伝子などが含まれる（Toda et al., 1989）。第2のグループには、mRNAが予定胞子細胞の分化に伴って特異的に蓄積するもので、胞子嚢内のマトリックス・タンパク質のひとつをコードするDp87遺伝子、並びに胞子外被タンパク質の一つであるSP96をコードしているcotA遺伝子など

が含まれる (Tasaka et al., 1990)。第3のグループは、mRNAが予定柄細胞の分化に伴って特異的に蓄積するもので、Dt100、Dt114遺伝子などを含んでいる。

本研究では、これらの遺伝子について、その細胞型特異的な発現調節機構の解析を行なった。まず、これらの遺伝子の発現が転写レベルで調節されているかどうかを単離細胞核を用いたrun-on assayにより調べた (第3章)。次に、これらの中で予定胞子細胞で特異的に転写されるが、胞子外被タンパク質遺伝子群とは発生過程における発現様式の異なるDp87遺伝子の転写調節に関与するシス領域およびそれに相互作用する核内因子の解析を行なった (第4章)。

A



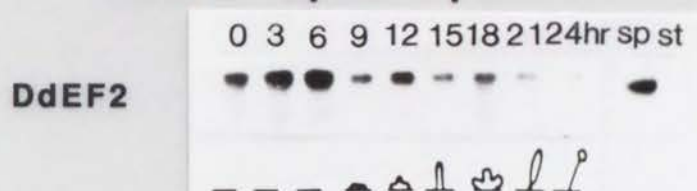
B



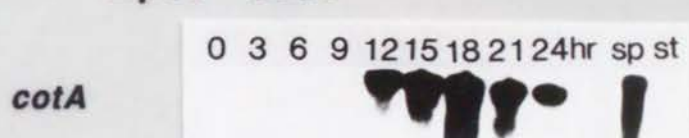
図1. 細胞性粘菌の発生と細胞分化。(A) 細胞性粘菌の生活環。(a) 増殖期；(b) 集合初期；(c) 集合後期 (stream形成期)；(d) 集合体 (mound)；(e) 乳頭状突起形成期；(f) 移動体期；(g) 子実体形成初期 (Mexican Hat期)；(h) 子実体形成期；(i) 子実体。sp, 孢子塊；st, 柄。(B) 移動体における両予定細胞の分布。予定柄細胞領域を白抜きで、予定孢子細胞領域を陰をつけて表した。矢印は移動体の進行方向を示す。

Cell-Type-Enriched Genes Classified by Accumulation Pattern of mRNA

Group 1; Prespore Enriched and Continuously Accumulated
DdEF2 · Dp28 · Dp34



Group 2; Prespore Enriched and Developmentally Regulated
Dp87 · *cotA*



Group3; Prestalk Enriched and Developmentally Regulated
Dt100 · Dt114 · *ecmB* · *ecmA* · D11

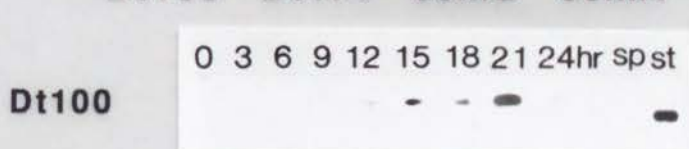


図 2. mRNAの蓄積様式による細胞型特異的遺伝子の分類。それぞれのグループの中で代表的な遺伝子の発生過程並びに予定胞子細胞 (sp) 予定柄細胞 (st) での mRNA の蓄積を示した。レーン上の数字は発生開始後の時間を表す。

第2章 材料と方法

粘菌細胞の増殖および発生

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* 野性株 NC-4 株あるいは AX-2 株を本研究で用いた。NC-4 株の胞子を *Klebsiella aerogenes* と共に SM 寒天培地 [1% glucose, 1% Bacto Peptone (Difco 製), 4mM MgSO_4 , 16mM KH_2PO_4 , 7mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.1% yeast extract (Difco 製), 2% agar] 上で静置培養するか、あるいは KK_2 緩衝液 (20mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6.4) 中で 22°C で振とう培養することで増殖期の細胞を得た (Sussman, 1966)。一方、AX-2 株の細胞は HL-5 培地中で無菌的に 22°C で振とう培養した (Watts and Ashworth, 1970)。前述の条件下で $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/ml まで振とう培養した粘菌細胞を、遠心沈降により集菌し、 KK_2 緩衝液で洗った後、 KK_2 緩衝液に浸したニトロセルロースフィルター (Millipore 製) あるいは 1.2% 寒天上に広げて 22°C で静置培養することにより発生させた。

組み換え DNA 操作

本研究における DNA の切断・結合・大腸菌への DNA の導入などの組み換え DNA 操作および DNA 塩基配列の決定はすでに確立されている方法に従って行なった (Maniatis et al., 1989)。

細胞核の単離

細胞核の単離は以前に記述されている方法を改変して行なった (Jacobson et al., 1974; Obara and Suzuki, 1988)。寒天培地あるいはニトロセルロースフィルター (Millipore 製) 上で特定の発生過程まで発生させた細胞は集菌後、20mM EDTA を含む KK_2 緩衝液で洗浄し、A 緩衝液 [50mM HEPES, 2.5% Ficoll, 0.5M sorbitol, 0.008% spermidine, 1mM DTT, 0.5% Triton X-100, pH 7.5] に懸濁して氷中に 5 分間

置いた後、Dounce homogenizer (tight fitting) で1~2ストロークのホモジェナイズすることにより細胞膜を破碎した。細胞の残滓および壊れていない細胞は4℃で5分間遠心沈降 (500×g) する事により沈澱として除いた後、上清を4℃で5分間遠心沈降 (3000×g) することで白色の核沈澱画分を得た。得られた核画分を核保存緩衝液 [10mM Tris-HCl, 2.5% Ficoll, 0.5M sorbitol, 0.008% spermidine, 1mM DTT, 5mM MgCl₂, 50% glycerol, pH 7.4] に懸濁し実験に用いるか、直ちに液体窒素中で凍結させて-70℃で保存した。どちらの核懸濁液を用いた場合でも実験結果に差はみられなかった。

単離核によるrun-on反応

上述の方法で得られた細胞核懸濁液に等量の2×転写反応緩衝液 [80mM Tris-HCl, 20mM MgCl₂, 500mM NaCl, 2mM DTT, 0.32mM ATP, 0.32mM GTP, 0.32mM CTP, 0.17mM α -[³²P] UTP (3000Ci/mmol, Amersham製), pH 8.0] を加えた後、23℃で30分間転写反応を行なった (Jacobson et al., 1974)。SDS溶液を最終0.1%になるように加えて反応を停止させ、これをフェノール/クロロフォルム処理でRNAを抽出し、転写産物を100mM Na₄P₂O₇存在下で10%トリクロロ酢酸により不溶化した後、これをニトロセルロースフィルター上に吸着させて取り込まれなかった標識されたUTPを取り除いた。転写産物はフィルターをTES緩衝液 (30mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.5% SDS, pH 7.5) 中で65℃で10分間の保温を2回繰り返すことで再び可溶化してから、エタノール沈澱により濃縮・精製し、これをハイブリダイゼーション実験に用いた。

DNA プロッティング及びハイブリダイゼーション

細胞性粘菌の遺伝子のcDNAを含む組み換えプラスミド Actin 6・DdEF 2・cDp28・cDp34・cDp87・cDp16 (SP96; cotA)・cDt100・cDt114・pDd56・pDd63・D11はそのままドットプロット装置によりドットあたり2 μ gずつナイロンフィ

ルターに移した (Groudine et al, 1981 ; Treisman and Maniatis, 1985) 。これらのフィルターを80℃で2時間保温してDNAをフィルター上に定着させ、プレハイブリダイズ溶液 [5× SSC (0.75M NaCl, 75mM sodium citrate), 50mM リン酸緩衝液, 5×デンハルト溶液 (0.1% bovine serum albumin, 0.1% Ficoll, 0.1% polyvinyl-pyrrolidone) , 50% formamide, 100 μg/ml 熱変性サケ精子DNA, pH 5.95] 中で42℃で2時間以上保温し、その後上記の放射標識された転写産物とハイブリダイズ溶液 (5×SSC, 50mMリン酸緩衝液, 5×デンハルト溶液, 50% formamide, 10% dextran sulfate, pH 5.95) 中で42℃で15時間以上ハイブリダイズさせた。その後、フィルターを0.1% SDSを含む2×SSC溶液で室温で5分間洗い、さらに0.1% SDSを含んだ0.1×SSC溶液中で55℃で10分間の洗浄を2回繰り返し、乾燥後オートラジオグラフィを行なった (Ozaki et al., 1988) 。フィルター上の放射活性はバイオイメージアナライザーFUJIX BAS2000 (富士フィルム製) で測定し、プラスミドベクターpTZ18Rでの測定値をバックグラウンドとして補正を行ない、アクチン遺伝子での測定値に対する相対値で示した。

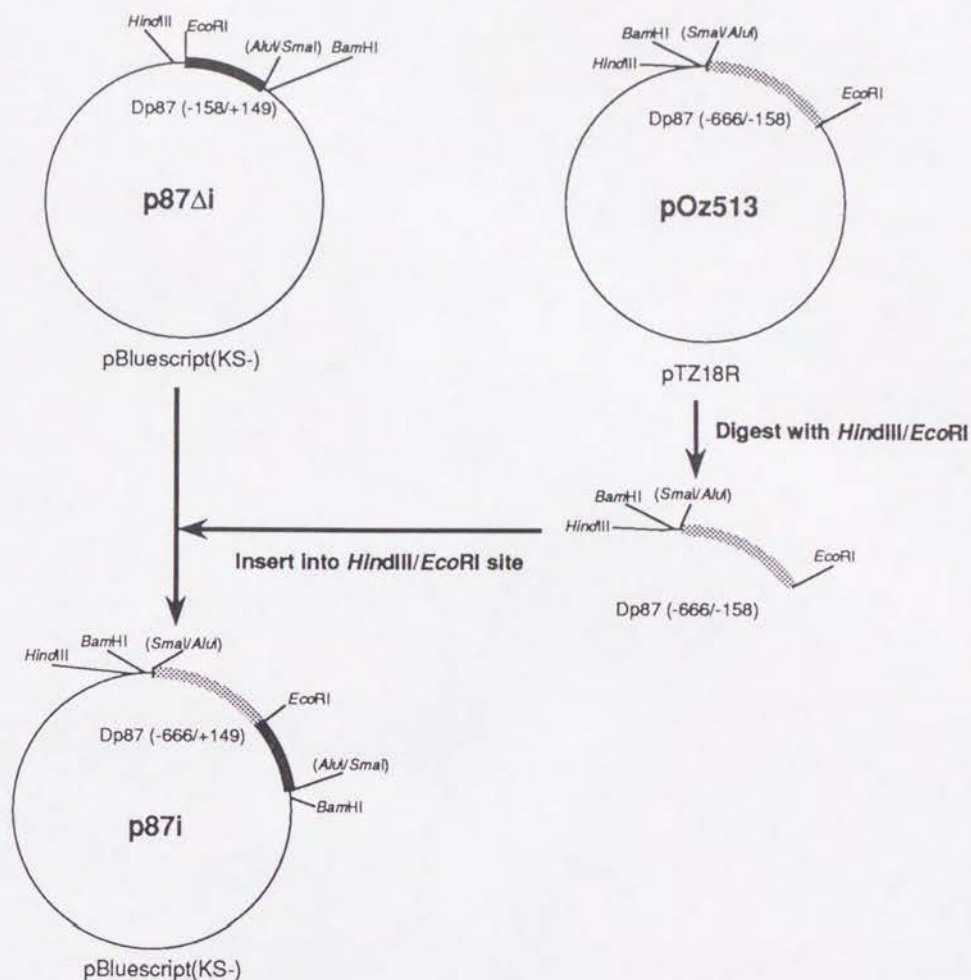
形質導入ベクターDNAの作製

まず基本となる5' 上流域断片を得るために、Dp87遺伝子の*AluI*-*EcoRI*断片 (転写開始点より-666~-158) をベクタープラスミドpTz18Rの*SmaI*-*EcoRI*部位にサブクローンした (pOz513) 。一方、*EcoRI*-*AluI*断片 (同-158~+149) の*AluI*部位側に*Bam*HIリンカー (5' -CTTGGGATCC- 3') をつないだ後、ベクタープラスミドpBluescriptII KS-の*EcoRI*- *Bam*HI部位にサブクローンした (pDp87Di) 。プラスミドpOz513より回収したDp87遺伝子の-666~-158を含む*Hind*III-*EcoRI*断片をプラスミドpDp87Diの*Hind*III-*EcoRI*部位につなぎ、プラスミドpDp87iを得た (図3) 。Dp87遺伝子の5' 上流域の改変はこのプラスミドを基に行なった。図9Bの遺伝子4のシリーズで5' 上流域に挿入したDNA断片はそれぞれ以下の通りである ; 5'-ATCGAATTAGCTTGAT-3' (キメラ遺伝子4-1) ・ ATCGAATT (キメラ遺伝子4-2) ・

ATCG AATTGGTC (キメラ遺伝子4-3) ・ ATCG AATTCCTG CAGCCC (キメラ遺伝子4-4・4-5)。図10のキメラ遺伝子5のシリーズにおいて、増殖期および予定柄細胞における転写活性を上げるために粘菌アクチン6遺伝子の5'上流域のTATA boxとoligo (dT) stretchを含まない*EcoRI-DdeI*断片 (-553~-75) をDp87遺伝子の5'上流域につないだ (Nellen et al., 1986)。

改変を加えた5'上流域は粘菌細胞の形質転換ベクタープラスミドSP60- β -galactosidase・pDDgal(H)あるいはA15D β -GALの*BamHI*部位に挿入した(図3B)。それぞれのベクタープラスミドについて、ジデオキシ法によるDNA塩基配列決定で上流域およびレポーター遺伝子が正しくつながっていることを確認した (Maniatis et al., 1989)。

A



B

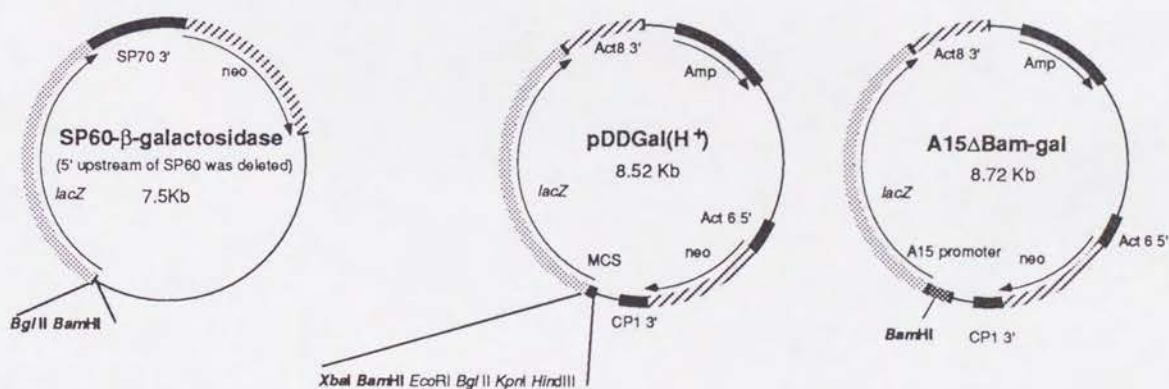


図 3. 形質導入ベクターDNAの作製。(A) Dp87遺伝子の上流域を含むプラスミドp87i作製の手順。(B) 本研究に用いた形質導入ベクター。プラスミドp87i上で様々に改変したDp87遺伝子の上流域をこれらのベクターの太字で示した制限酵素認識部位に挿入した。β-ガラクトシダーゼコード領域(lacZ)の下流には、転写終結のためにcotB遺伝子(SP70 3')あるいはアクチン8遺伝子の3'下流域(Act8 3')が挿入されている。いずれのベクターにも、形質導入のマーカー遺伝子として、G418耐性遺伝子(neo)を持っている。

粘菌細胞への形質導入

粘菌細胞への形質導入は、エレクトロポレーション法により以下の要領で行なった (Howard et al., 1988)。HL-5培地中で $1\sim 3\times 10^6$ 細胞/mlまで振とう培養した AX-2株粘菌細胞を遠心沈降により集菌し、 6×10^7 細胞/mlになるように E緩衝液 (10mM Na/Kリン酸緩衝液, 50mM sucrose, pH 6.1) に懸濁した。この細胞懸濁液 0.2mlに形質導入する DNA $15\mu\text{g}$ を加え、氷上で4分間放置した。これをエレクトロポレーション装置 (Gene-Pulsar, Bio-rad製) を用いて電圧1.1kV・コンデンサー電気容量 $3\mu\text{F}$ ・電極間距離0.2cmでエレクトロポレーションをおこなった。その際に抵抗値 5Ω の抵抗を挿入した。10分間氷上で放置後、プラスチックシャーレに移し、100mM CaCl_2 ・100mM MgCl_2 溶液を $2\mu\text{l}$ 加えて室温で15分間静置した。これにHL-5培地10mlを加えて 22°C で12~24時間静置培養した。その後、 $20\mu\text{g/ml}$ G418を含む HL-5培地に交換し、さらに2~3日毎に培地を交換しながら 22°C で静置培養して薬剤耐性細胞を選択した。1回の操作で1~20コロニーの薬剤耐性株が得られるが、以下の形質導入株を用いた解析には1回の操作で得た耐性株をまとめて用いた。

予定胞子細胞と予定柄細胞の分離

予定胞子細胞および予定柄細胞の大量調製のために、移動体を BAL/pronase混液で分散した後、以前に報告された方法を改変した密度勾配遠心分離法によって両予定細胞画分を分離した (Ratner and Borth, 1983; Ozaki et al., 1988)。それぞれの細胞画分の純度は、FITCを結合した抗*D. discoideum*胞子モノクローナル抗体 (mab346, mab82) で細胞を染色することによって検定した (Tasaka et al., 1988)。予定胞子細胞画分には2~6%の予定柄細胞が、予定柄細胞画分には4~9%の予定胞子細胞が混在していた。

細胞抽出液内の β -ガラクトシダーゼ活性の測定

増殖期および20mM EDTAを含む KK_2 緩衝液中で分散した移動体期の細胞を KK_2 緩

衝液で洗浄し、TMS緩衝液（50mM Tris-HCl, 0.1M NaCl, 10mM MgCl₂, pH 7.5）に懸濁してさらに-80℃での凍結・25℃での融解を繰り返すことにより細胞抽出液を得た。適度に希釈した細胞抽出液20 μ lに β -メルカプトエタノール7.2 μ lおよび10mM ONPG（*o*-nitro-phenyl- β -D-galactopyranoside）80 μ lを加えて25℃で10分間反応させることによって β ガラクトシダーゼ反応を行なった。その後、0.5M K₂CO₃溶液を200 μ l加えて反応を停止し、遠心沈降後上清の波長420nmにおける吸光度を測定した（Steers Jr. and Cuatrecasas, 1974；Dingermann et al., 1989）。この反応系において、10mM ONPGの代わりにTMS緩衝液を加えたものの吸光度からバックグラウンドを補正し、反応系中のタンパク質一定量あたりの β -ガラクトシダーゼ活性を計算した。タンパク質の定量はBradford法に従って行なった（Bradford, 1976）。

多細胞体におけるレポーター遺伝子発現領域の組織化学染色法による検出

ニトロセルロースフィルター上で発生させた粘菌細胞を1%グルタルアルデヒドを含むZ緩衝液（60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 2mM MgCl₂, 1mM MgSO₄）に30分～4時間浸して固定した。これをZ緩衝液で2回洗浄した後、染色液 {0.1% X-gal, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆を含むZ緩衝液} 中に37℃で2時間～1日静置し、染色した（Dingermann et al., 1989）。

RNAの分離とノーザン法による解析

増殖期および移動体期の細胞より、4M グアニジンチオシアネートの代わりに8M グアニジン塩酸塩を用いたAGPC法（acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform）によって細胞の全RNAを分離した（Chomczynski and Sacchi, 1987）。得られたRNAをホルムアルデヒド処理により変性させた後、ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルを用いて電気泳動し、ナイロンメンブレンフィルター（Hi-Bond N⁺, Amersham製）へ移した。このフィルターを³²Pで放射標識したDNAプローブを前述

の方法でハイブリダイズさせ、洗浄した後にX線フィルムによるオートラジオグラフィあるいはFUJIX BAS2000イメージアナライザー（富士フィルム製）による解析を行なった。

粘菌細胞核抽出液の調製

$5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ の増殖期あるいは移動体期の細胞を集め20mM EDTAを含む KK_2 緩衝液および0.2% NaClで洗浄した後、NI緩衝液（50mM Tris-HCl, 5mM Mg-Acetate, 10% sucrose, 2% NP-40, 0.5mM PMSF, pH 7.5）に懸濁した。氷上に5分間放置した後、5分間遠心沈降（ $500 \times g$ ）する事により細胞の残滓および壊れていない細胞を沈澱として除き、さらに上清を5分間遠心沈降（ $3000 \times g$ ）して白色の核沈澱画分を得た。これを少量のNI緩衝液に懸濁し、さらに等量の緩衝液II（10mM Hepes, 0.6M NaCl, 5mM MgCl_2 , 0.1mM EDTA, 0.5M sucrose, 0.5% NP-40, 1mM DTT, 5mM spermidine, 0.5mM PMSF, pH 7.9）を加え、穏やかに混合しながら氷上に60分間放置した。これを微量高速遠心機で5分間遠心沈降（15000 rpm）した上清を緩衝液III（10mM Hepes, 50mM NaCl, 1mM MgCl_2 , 0.5mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5mM PMSF, 20 % glycerol, pH 7.9）に対して2時間以上透析した。透析後、微量高速遠心機で5分間遠心沈降（15000 rpm）して上清を粗核抽出液として用いた。以上の操作は全て4℃で行なった。

ゲル移動度シフト法

DNA-核内因子複合体形成反応は、 ^{32}P 放射標識したプローブDNA 1~2.5ng、poly (dA/dT) DNA 5 μg および競合体DNAを含むTNE緩衝液（20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.5）5 μl に粘菌細胞核抽出液5 μl を加えて混合した後、室温で30分放置することにより行なった。これを1×TBE（50mM Tris-Borate, 1mM EDTA, pH 8.3）で調製した5%ポリアクリルアミドゲルを4℃、150Vで30分以上予備泳動したものに添加し、4℃、150Vで2~4時間電気泳動した。泳動後、ゲルを

乾燥してオートラジオグラフィーを行なった。

Heparin-Sepharoseカラムクロマトグラフィー

緩衝液IIIで平衡化したHeparin-Sepharose CL-6B (Pharmacia製) 3 mlを直径10mmのカラム (Pharmacia製C10/10カラム) に充填した。10¹¹細胞の移動体より調整した粗核抽出液6.5ml (12mg) を流速0.7ml/分で添加し、25mlの緩衝液IIIで洗浄した。その後、0.2M、0.4M、0.5M KClを含む緩衝液IIIで順次溶出と洗浄を繰り返した。各溶出画分のタンパク質量をBradford法で定量し、その中で最もタンパク質量の多い画分3本をまとめて (総量 3 ml)、0.02% NP-40を含む緩衝液III (緩衝液IIIN) に対して4℃で2時間透析した。

DNAアフィニティーカラムクロマトグラフィー

Dp87遺伝子の5' 上流域内の領域B1・B2に存在するCA-boxを含み両端にEcoRIリンカーを持つ2本鎖DNA

B1-CA AATTCACACCCACAATAAG
 GTGTGGGTGTTATTCTTAA

B2-CA AATTCACACCCTAGACTTG
 GTGTGGGATCTGAACTTAA

を合成し、それぞれをT4 DNA ligase反応で連結した後、これを担体ゲルとのカップリング反応させた。活性化CNBr基を持つSepharose 4B (Pharmacia製) 2 gを1 mM HClで膨潤させた後、10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) に懸濁した。これに直列化したB1-CA・B2-CA DNAをそれぞれ1.5mg加え、室温で穏やかな攪拌の下でカップリング反応を行なった。反応後、100mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 1mMEDTA, pH 8.0中で攪拌して洗浄することで未反応のCNBr基をブロックし、これをDNAアフィニティー担体として用いた (Briggs et al., 1986)。カップリング効率は、10mMリン酸カリウム緩衝液中の未反応のDNAを定量することにより求め、55.2%のカップリング効率を得た。

DNAアフィニティー担体ゲル0.6mlを0.5mm径のカラム（Bio-Rad製）に充填して緩衝液IIIで平衡化した。緩衝液IIINで透析したHeparin-Sepharose 0.4 M KCl溶出画分を0.3ml/分の流速で添加後、緩衝液IIINでカラムを洗浄した。カラムに結合したタンパク質は、0.2M・0.5M・1.0M KClを含む緩衝液IIINで溶出した。

第3章 細胞型特異的な遺伝子の発現調節様式の解析

研究の背景

遺伝子が最終的な機能を発現するまでのステップにはいくつかの調節機構が存在する。その代表的なものとしては、遺伝子の転写の特異性や転写量を調節する機構、転写されたRNAを特異的にプロセッシングする機構、mRNAの安定性を調節する機構、翻訳段階で見られる調節機構、および翻訳されたポリペプチドのプロセッシング・修飾・輸送などの活性化・不活性化機構や、タンパク質の安定性を決定する機構等が知られている。それぞれの遺伝子は、これらのひとつの段階、あるいは複数の段階において特異的に発現調節を受けている。従って、対象とする遺伝子がどの段階で調節されているかを明らかにすることが、その遺伝子の特異的発現の調節機構の解明の重要な最初のステップである。

第1章で述べた尾崎らによってクローン化された予定胞子細胞、あるいは予定柄細胞に特異的な一群の遺伝子はそのmRNAの存在様式から、(1) mRNAが増殖期より発生過程を通じて存在し、移動体においては予定胞子細胞に特異的に存在するもの(グループ1)、(2) mRNAが予定胞子細胞の分化に伴って特異的に蓄積するもの(グループ2)、(3) mRNAが予定柄細胞の分化に伴って特異的に蓄積するもの(グループ3)の3つのグループに分類できる(図2)。このことは、これら遺伝子の細胞型特異的な発現は少なくとも上記のうち転写レベル、転写されたRNAのプロセッシング、mRNAの安定性のいずれかのレベルで調節されていることを示している。そこで本章では、これらの遺伝子ならびに予定柄細胞の分化に伴って特異的に発現する遺伝子*ecmB* (pDd56) や*ecmA* (pDd63) およびD11の発現が転写レベルで調節されているかどうかを調べるために、さまざまな発生過程の細胞および移動体の予定胞子細胞および予定柄細胞から単離した細胞核を用いてrun-on assayを行った。

結果

発生過程における転写パターン

様々な発生段階（増殖期・集合期・乳頭状突起形成期・移動体期・子実体形成前期）の細胞より単離した細胞核を用い、放射標識したヌクレオチド存在下で*in vitro* 転写反応を行った。次に、各段階から得られた転写産物の一定量を用いて、調べたいmRNAに対応するcDNAとハイブリダイゼーションを行なった。*In vitro* 転写反応が行なわれたかどうかは、これらの発生段階において転写が確認されている粘菌アクチン遺伝子のcDNAを用いて調べた。すなわち、それぞれのcDNAにハイブリダイズした転写産物の量をバイオイメージアナライザーで測定し、アクチン遺伝子の転写産物の量と比較することで標準化した。それぞれの実験は少なくとも4回行ない、基本的に同一の結果を得た。

予定胞子細胞に偏って発現するDp87遺伝子と*cotA*遺伝子（グループ2）及び予定柄細胞に偏るDt100、Dt114、*ecmB*、*ecmA*、D11遺伝子（グループ3）のmRNAは多細胞体が形成された後に初めて細胞内での蓄積が認められた。図4および表1にみられるように、これらの遺伝子の転写産物は乳頭突起形成期に初めて検出され、以後移動体期、子実体形成期の細胞核においても転写が確認された。このことはこれらの遺伝子が増殖期・集合期には転写されておらず、それ以降に転写が始まり、それが継続することを示しており、転写パターンはmRNAの蓄積パターンとほぼ一致した。

一方、mRNAが増殖期より発生過程を通じて存在し、移動体において予定胞子細胞に偏って蓄積するDdEF2、Dp28、Dp34の各遺伝子（グループ1）の場合には、増殖期を含めて調べた全ての発生段階の細胞核において転写が確認された（図4，表1）。この結果はこれらの遺伝子のmRNAが増殖期のみならず発生過程を通じて常に転写されていることを示しており、またこれらの遺伝子の転写パターンもmRNAの蓄積パターンと一致していた。

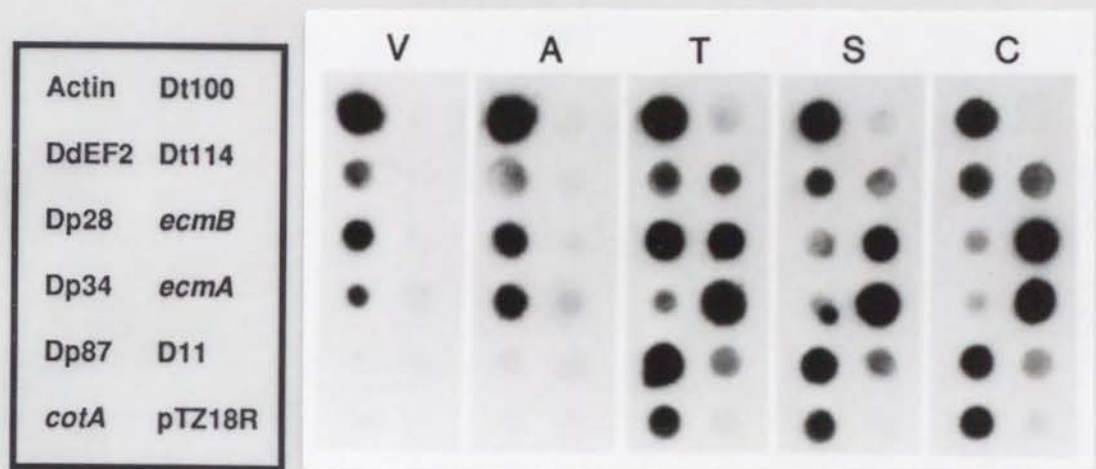


図 4. 発生過程におけるそれぞれの遺伝子の転写パターン。各発生段階の細胞から単離した核を用いて α - ^{32}P UTP 存在下で *in vitro* 転写反応させることで転写産物を放射能で標識し、細胞型特異的な遺伝子の cDNA を含むプラスミドのドットプロット (各 $2\ \mu\text{g}$) にハイブリダイズさせた。ベクタープラスミド pTZ18RDNA をハイブリダイゼーションのバックグラウンドとして用いた。各ドットと遺伝子の対応関係を左のカラムに示した。V, 増殖期; A, 集合期; T, 乳頭状突起形成期; S, 移動体期; C, 子実体形成初期 (Mexican Hat 期)。

表 1. 発生過程におけるそれぞれの遺伝子の転写パターン

Genes	Accumulation Pattern	Developmental Stages				
		Veg.	Agg.	Tip	Slug	Culm.
Actin	----	++	++	++	++	++
DdEF2	cont/psp	+	+	+	+	+
Dp28	cont/psp	+	+	+	+	+
Dp34	cont/psp	+	+	+	+	+
Dp87	dev/psp	-	-	+	+	+
<i>cotA</i>	dev/psp	-	-	+	+	+
Dt100	dev/pst	-	-	+	+/-	-
Dt114	dev/pst	-	-	+	+	+
<i>ecmB</i>	dev/pst	-	-	+	+	+++
<i>ecmA</i>	dev/pst	-	-	+	+++	+++
D11	dev/pst	-	-	+	+	+

図 4 のそれぞれのドットの放射能活性をFUJIX BAS2000を用いて定量し、pTZ18Rにおける放射能活性によりバックグラウンド補正を行った後、同じ発生段階でのアクチン遺伝子における放射能活性で標準化した。+++，非常に強い転写活性が見られた（アクチン遺伝子の200%以上）；++，強い転写活性が見られた（アクチン遺伝子の100～200%）；+，転写活性が見られた（アクチン遺伝子の5～100%）；+/-，弱い転写活性が見られた（アクチン遺伝子の3～5%）；-，転写活性が見られなかった（アクチン遺伝子の3%以下）。

細胞型特異性

これらの遺伝子のmRNAがどちらか一方の予定細胞においてのみ特異的に蓄積するのは、細胞型特異的な転写による結果であるのかどうかを調べるために、Percoll密度勾配遠心法により分けられた予定胞子細胞及び予定柄細胞画分より調製した細胞核を用いてrun-on assayを行なった。次に、それぞれの細胞画分における各遺伝子の転写量をアクチン遺伝子の転写量で標準化し、予定柄細胞と予定胞子細胞画分における転写量の比を求めて表2に示した。なお、アクチン遺伝子の予定柄細胞、予定胞子細胞における転写量の比は、1:1.2であった。また、予定胞子細胞画分には2%、予定柄細胞画分には5%の他方の予定細胞の混入が認められた。

mRNAが予定胞子細胞に偏って蓄積するDp87遺伝子と*cotA*遺伝子に由来する転写産物は予定胞子細胞画分由来の細胞核でのみ検出された(図5, 表2)。*ecmB*遺伝子と*ecmA*遺伝子の予定柄細胞画分における転写量は、予定胞子細胞画分の20倍以上であった。実験に用いた予定柄細胞画分に5%の予定胞子細胞が混在していたことを考慮に入れると、これらの遺伝子は予定柄細胞のみで転写されていると考えられる。このことは、上記の4つの遺伝子は転写レベルで細胞型特異性が調節されることを示している。

一方、増殖期より発生過程を通じてmRNAが存在し、移動体において予定胞子細胞に特異的に蓄積するDdEF2、Dp28、Dp34の各遺伝子は、予定胞子細胞や予定柄細胞画分のいずれでも転写されていた(図5, 表2)。また、mRNAが集合期以降に予定柄細胞特異的に蓄積する遺伝子Dt100、Dt114、D11の3者は両方の予定細胞画分でも転写物が検出された。この結果はこれらの遺伝子のmRNAが細胞型特異的に蓄積される機構には転写後の調節が関与していることを示唆している。



図 5. 転写の細胞型特異性。移動体より単離した両予定細胞の核を用いて図 4 と同様に転写産物を³²Pで標識し、ドットプロットにハイブリダイズさせた。各ドットと遺伝子の対応関係を左のカラムに示した。Sp, 予定胞子細胞画分；St, 予定柄細胞画分。

表 2. 転写の細胞型特異性

Genes	Accumulation Pattern	Prestalk/Prespore Ratio
DdEF2	cont/psp	6.77
Dp28	cont/psp	4.50
Dp34	cont/psp	2.54
Dp87	dev/psp	undetected in prestalk
<i>cotA</i>	dev/psp	undetected in prestalk
Dt100	dev/pst	1.72
Dt114	dev/pst	4.79
<i>ecmB</i>	dev/pst	21.5
<i>ecmA</i>	dev/pst	20.1
D11	dev/pst	4.06

図5のそれぞれのドットの放射能活性を表1と同様にして測定・標準化した後、それぞれの遺伝子での予定胞子細胞画分に対する予定柄細胞での放射能活性の比を求めた。Dp87・*cotA*遺伝子においては、予定柄細胞画分での放射能活性がバックグラウンドを下回った。

第4章 Dp87遺伝子の予定胞子細胞特異的な転写調節機構の解析

研究の背景

Dp87遺伝子は、そのmRNAが予定胞子細胞に偏って存在する遺伝子として単離された(Ozaki et al., 1988)。そして、その塩基配列から予想される翻訳産物の構造および抗体を用いた解析から、この遺伝子は胞子嚢内の細胞外マトリックスの構成成分のひとつをコードしているものであることが明らかにされた (Nakao et al., in press)。また、Dp87遺伝子上流域をレポーター遺伝子 (β -ガラクトシダーゼ遺伝子) につないで粘菌細胞に形質導入し、形質導入細胞の発生過程におけるレポーター遺伝子の発現パターンを調べた実験から、この遺伝子は単細胞アメーバが集合して細胞の流れを形成する時期に転写され始めることが明らかにされた。これは、この遺伝子が現在知られている予定胞子細胞特異的な遺伝子の中で最も早く転写を開始する遺伝子であることを示している。この遺伝子のmRNAは、乳頭状突起形成期から移動体期にかけて急速に蓄積されるが、胞子外被タンパク質群遺伝子とは異なり子実体形成後期に消失する (Ozaki et al., 1988)。また、前章で明らかにした様に、その細胞型特異的な発現は主として転写レベルで調節されている。このような特徴、特にmRNAの出現時期が他の予定胞子細胞特異的な遺伝子に比べ早いことから、Dp87遺伝子の転写調節機構を調べることは予定胞子細胞分化の最も初期段階における遺伝子発現の調節機構を理解する手がかりになると期待される。

一般に、真核生物のmRNAをコードする遺伝子の転写を調節する因子として、遺伝子上に存在する特定の塩基配列 (シス調節因子) と、それに特異的に相互作用するタンパク質などの可溶性分子 (トランス調節因子) が知られている。シス調節因子は、転写開始点付近にあってRNAポリメラーゼを含む基本転写装置が結合するコア・プロモーター領域と、その上流あるいは下流に存在し転写の効率・速度や特異

性を規定する調節領域とエンハンサー領域に分けられる。そして、多くの例でこれらシス領域とそれに特異的に相互作用するトランス因子の組み合わせが分化した細胞に特異的な転写調節に重要な役割を果たしていることが知られている (Maniatis et al., 1987)。

本章の実験は、Dp87遺伝子の予定胞子細胞特異的な転写に関わる調節機構を明らかにすることを目的として行なわれた。すでに予備実験として、この遺伝子の5'上流域を5'側より下流に向かって順次欠損させたものにレポーター遺伝子であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（以下CAT遺伝子と表記する）のコード領域につなぎ、これを粘菌細胞に形質導入して発生過程におけるこの遺伝子のプロモーター活性が調べられていた（図6）。その結果によると、（1）-734~-447の領域（転写開始点を+1とする）に転写の効率に関する正の調節領域が存在する、（2）-447~+149の領域があれば予定胞子細胞に特異的な転写調節に十分である、（3）さらに-356まで削除すると移動体におけるCAT活性は低く、増殖期の細胞に見られる活性と有意な差が認められなくなる、などの事柄が明らかにされた。これは、-447~-356の領域にDp87遺伝子の転写調節に重要な正の調節領域が存在することを示唆している。また、この領域には*cotC*遺伝子や*cotA*遺伝子において予定胞子細胞特異的な転写に重要であると考えられているCAに富む配列（CA-box；ACACCCA）が存在することも明らかにされていた（図7B）。しかしながら、この領域およびそこに含まれるこれらCAに富む配列が予定胞子細胞特異的な転写にかかわる領域なのか、それとも単に転写の効率に関する調節領域なのか、さらに、-356より下流の領域が予定胞子細胞特異的な転写に関与しているかどうかについては明らかにされていなかった。

本章では上記の問題を明らかにするために、予備実験で用いたCAT遺伝子より検出感度の高い β -ガラクトシダーゼ遺伝子（以下 β -gal遺伝子と記す）をレポーター遺伝子として用い、さまざまに改変したDp87遺伝子の5'上流域をこの遺伝子につないだキメラ遺伝子を粘菌細胞に形質導入することにより、この遺伝子の予定胞子

細胞特異的な転写に関与するシス調節領域についてより詳細な解析をおこなった。
さらに、これらの調節領域のひとつに特異的に相互作用する核内因子の解析も行な
った。

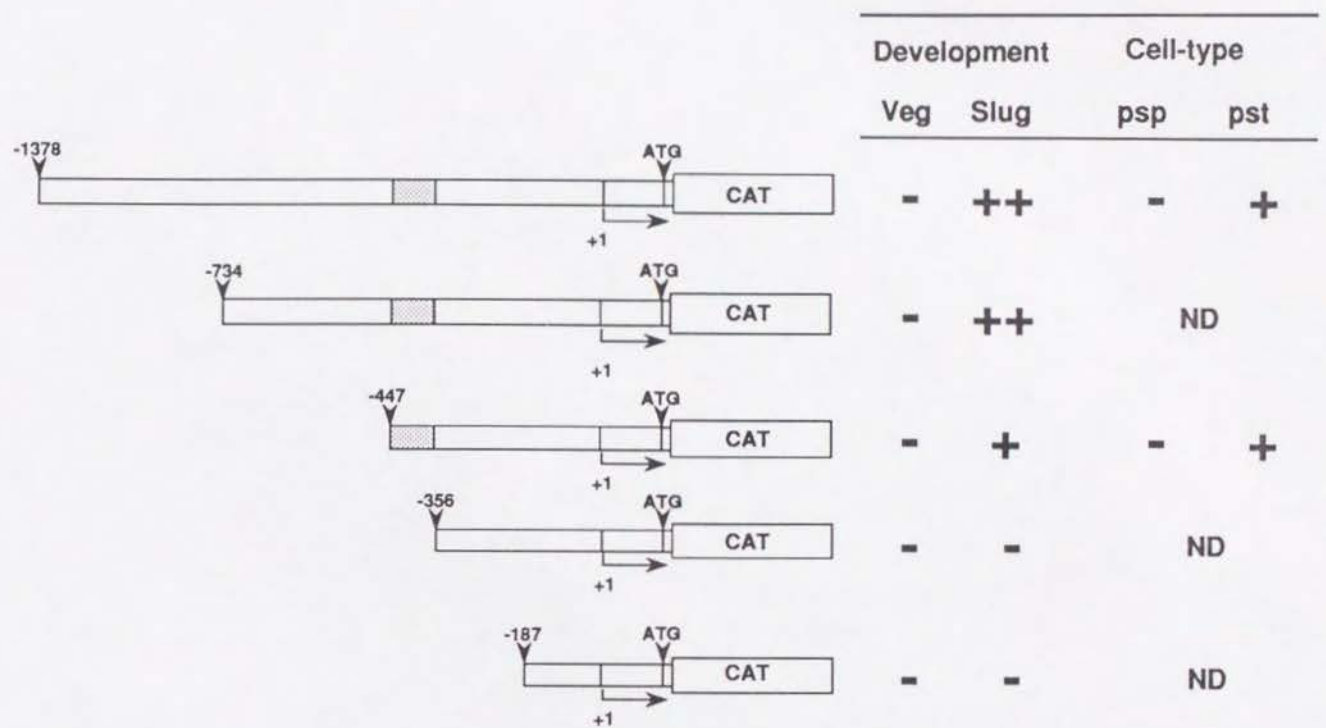
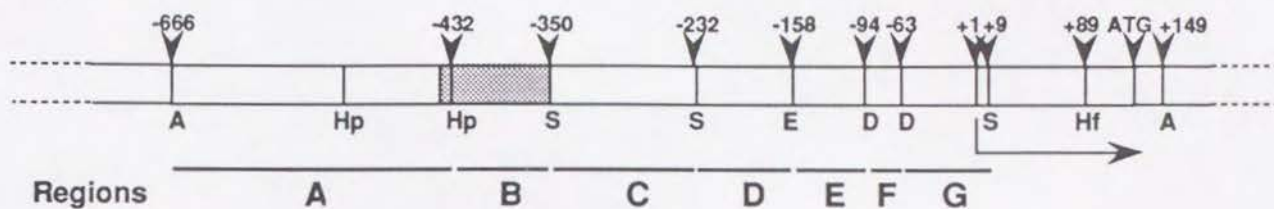


図 6. 以前の研究におけるDp87遺伝子の転写調節領域の解析結果のまとめ。Dp87遺伝子の5'上流域を5'側から順次削除し、CAT遺伝子のアミノ酸コード領域につないだキメラ遺伝子を粘菌細胞に導入して、得られた形質形質転換体の増殖期(Veg)・移動体期(Slug)におけるCAT活性を調べた。また、移動体より分離した予定柄細胞(pst)予定胞子細胞(psp)でのCAT活性を測定し、細胞型特異性を調べた。-, CAT活性が検出されなかった; +, CAT活性が検出された; ++, 強いCAT活性が検出された。なお、-734まで削除した場合の移動体におけるCAT活性は-447まで削除した場合に比べ約10倍高いものであった。

A



B

(-670)	ACAGCTATTC	ATATGCAAAA	AAACAAAAG	ACAGTGTTTA	AGTGGTAAAT
	<i>AluI</i>				
(-620)	AAATAGAAAA	AACAAATGTA	AAATCTCTTT	TATTTTATTT	TTATTTTATT
(-570)	TCATTTTTTT	TTATTTTTTT	TTTAAATTGT	TAATTCTGAT	GTGGTAAAT
(-520)	TGGGTGAGTG	AATTATAATT	TGAATAGTAA	TAATGGGATA	TGAAAAA
	<i>HphI</i>				
(-470)	AAAAAAAAA	AAAAAAAAA	AATGGCAATA	TGAAATACAA	ACAATTCACC
					<i>HphI</i>
(-420)	ACTTCATTAC	ACCCACAATA	ACACATATAC	ACCCTAGACT	TTTACAATT
(-370)	ACCAATTATA	TTATTCAAA	TATTGTATAT	GAAAAA	AAATAA
		<i>SspI</i>			
(-320)	AAAAAATAA	ATAATAA	TAATAA	AAAAAATAC	AATGTTGCAT
(-270)	CGCAATAGAT	TATCA CACAC	ACTTCGCACA	CTGTATAATA	TTAACACTAA
				<i>SspI</i>	
(-220)	CACCCATTTT	CACACAACAA	GTAATTATTT	TTACCACTAC	AATTTTCAGC
(-170)	CATACCTATA	TGAATTCATA	TGATTAATTT	ACAATTATAC	ATTGCTCAAT
		<i>EcoRI</i>			
(-120)	GTTATTATTA	TTATTATTAT	TATTTTAA	TTATTTTTTT	TATTTTTTTT
			<i>DraI</i>		
(-70)	TTTTTTTAA	ATTATTTATG	AAAAA	AAAAA	AAAAAATTAA
	<i>DraI</i>				
(-20)	TAATTAAATA	AATAAATA	AAAAATAAAT	ATTTTTTATA	ATTATAAAG
			+1	<i>SspI</i>	
(+31)	GGTATTAAAT	TTCAAATTCT	TTTCATTCA	TTCAATTTTG	TAATTATAAA
(+81)	AAAAGGAATC	AAATAATTAT	ATATATATAT	AAAAATATAA	AAAAAATAA
	<i>HinfI</i>				
(+131)	ATGAGAATTT	TATATTTAGC	TTCTCTTTTA	TTTTTAATTA	
	Met	<i>AluI</i>			

図 7. (説明は次頁)

図 7. Dp87遺伝子の5'上流域の構造。(A) Dp87遺伝子の5'上流域の制限酵素地図。図中の数字は転写開始点を+1とした時の相対位置を示している。本文中に表れる各領域の範囲を下線で示し、それぞれの領域の境界となる制限酵素認識部位を矢じりで示す。影をつけた領域は以前の解析において同定されたシス領域を示す(-447~-356)。A, *AluI*; D, *DraI*; E, *EcoRI*; Hf, *HinfI*; Hp, *HphI*; S, *SspI*。(B) Dp87遺伝子の5'上流域の塩基配列。転写および翻訳開始点をそれぞれ+1およびMetで表す。(A)で示した制限酵素認識配列を下線で示す。CA-box (ACACCCA) およびCAE類似配列を白ぬきで、予想されるTATA-boxを傍点でそれぞれ示す。(A)と同様に、影をつけた領域は以前の解析において同定されたシス領域を示す。

結果

5' および 3' 側からの欠失による解析

まず、レポーター遺伝子をCAT遺伝子からより検出感度の高い β -gal遺伝子に代えたときに以前の予備実験の解析結果が追試出来るかどうかを確かめた。Dp87遺伝子の5' 上流域と β -gal遺伝子とをつないだキメラ遺伝子の5' 欠損変異体を作製し、これを粘菌細胞に導入した。G418薬剤耐性によって選別された形質転換細胞株について、その増殖期と移動体期における β -gal酵素活性の測定と移動体のX-gal細胞染色による解析を行なった。このシリーズの実験も含め、全ての実験は1回のエレクトロポレーションによって得られた形質転換細胞株の集団をまとめて発生させたものについて行なった。同一のキメラ遺伝子については6回のエレクトロポレーション実験を行なった。各エレクトロポレーション実験で得られた結果は基本的に同一であり、図8～11で示した酵素活性は、その平均値を標準偏差と共に示した。以下、図8～11のそれぞれの実験の番号に対応するキメラ遺伝子およびその形質転換体をそれぞれ「キメラ遺伝子」、「形質転換体」の後に対応する番号を付けて表記してある。

図8 Aに示すように、-666～+149の領域を持つキメラ遺伝子1-1は、内在のDp87遺伝子と同様に、増殖期に転写産物が見られず移動体期において転写量が増大した。また、図8 C-aに示す様に、形質転換体1-1の移動体では予定胞子細胞領域にのみX-galによる染色が見られた。これはキメラ遺伝子1-1が内在のDp87遺伝子と同様な転写調節を受けていることを示している。このキメラ遺伝子1-1を基にして、以下の様々な5' 上流域の変異遺伝子を作製し、これらの遺伝子を持つ形質転換体におけるレポーター遺伝子の発現を調べて形質転換体1-1の結果と比較した。

キメラ遺伝子1-1の5' 上流域を-666より-432までを削除すると、移動体期における β -gal活性は減少するが、予定胞子細胞特異的な転写は見られた（図8 A，形質転換体1-2）。このことはDp87遺伝子の予定胞子細胞特異的な発現には-432～+149の領域があれば十分であり、また、-666～-433の領域（領域A，図7）に少なくとも予定

孢子細胞において正の転写調節を行う領域が存在することを示している。この結果は、以前の研究結果と一致していた。

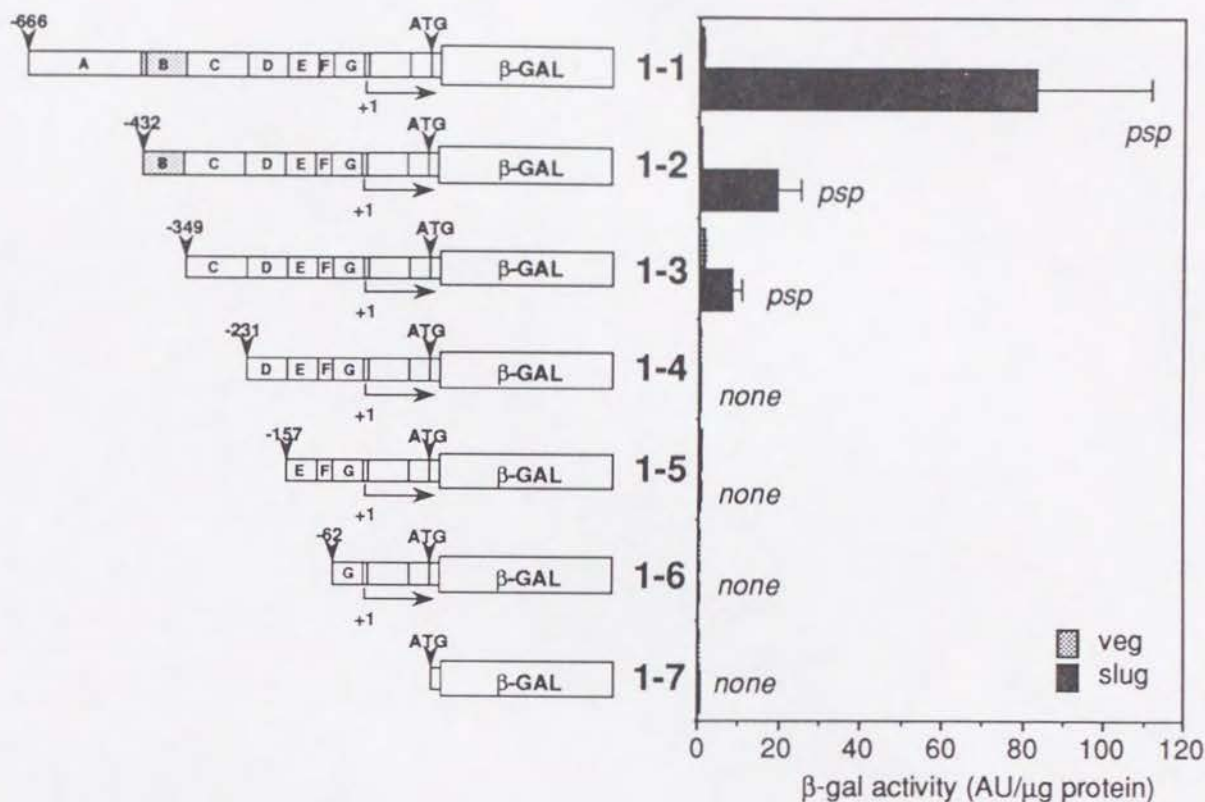
さらに 5' 側より-350まで削除した場合、形質転換体1-3は移動体期においては形質転換体1-2の β -gal活性よりもさらに減少するものの β -gal遺伝子のみを導入した形質転換体1-7よりも有意に高い活性を示した（図 8 A, 移動体期における形質転換体1-3および1-7の β -gal活性はそれぞれ 6.51 ± 2.16 AU/ μ gタンパク質・ 0.50 ± 0.28 AU/ μ gタンパク質であった）。また、移動体における予定孢子細胞特異的な発現は保たれていた（図 8 C-c）。この結果は、-356まで削除するともはや発生後期に特異的な転写活性が見られなくなったという以前のCAT遺伝子を用いた予備実験の結果と異なる。この原因は、レポーター遺伝子として用いた β -galの酵素活性の検出感度がCATよりも高いため、増殖期における活性との差が明確になったためと考えられる。これらの形質転換体1-1・1-2・1-3において、導入したキメラ遺伝子は全て予定孢子細胞領域に均等に発現しており、*cotC*遺伝子の異なる長さの上流域と β -gal遺伝子からなるキメラ遺伝子を導入した際に観察されたような調節領域の削除による発現パターンの部域的な変化は見られなかった（Haberstroh et al., 1990；図 8 C-a・b・c）。

これに対して、5' 側より-232・-157あるいは-62まで削除した場合、形質転換体はもはや移動体期における予定孢子細胞特異的な転写誘導を示さなかった（図 8 A, 形質転換体1-4・1-5・1-6；図 8 C-d）。一方、5' 上流域を3' 側から順次欠損させた場合には、+89まで削除しても、 β -gal活性および発現パターンは+149までを含む場合とほとんど変らなかった（図 8 B, 形質転換体1-1・2-1）。さらに+9まで削除した場合、発現量の減少が見られるものの、移動体期における予定孢子細胞に特異的な発現は保持されていた（図 8 B, 形質転換体2-2；図 8 C-e）。

以上の結果から、Dp87遺伝子の予定孢子細胞特異的な転写には-349～+9の領域があれば十分であり、-666～-433（領域A）・-432～-350（領域B）・-349～-231（領域C）に少なくとも予定孢子細胞において正の転写調節を行う領域が存在すること

が明らかとなった。同時に、予備実験で同定された領域（-447~-356；ほぼ領域Bに相当する）が予定胞子細胞特異的な転写に必ずしも必要不可欠な領域ではないことも示唆された。

A



B

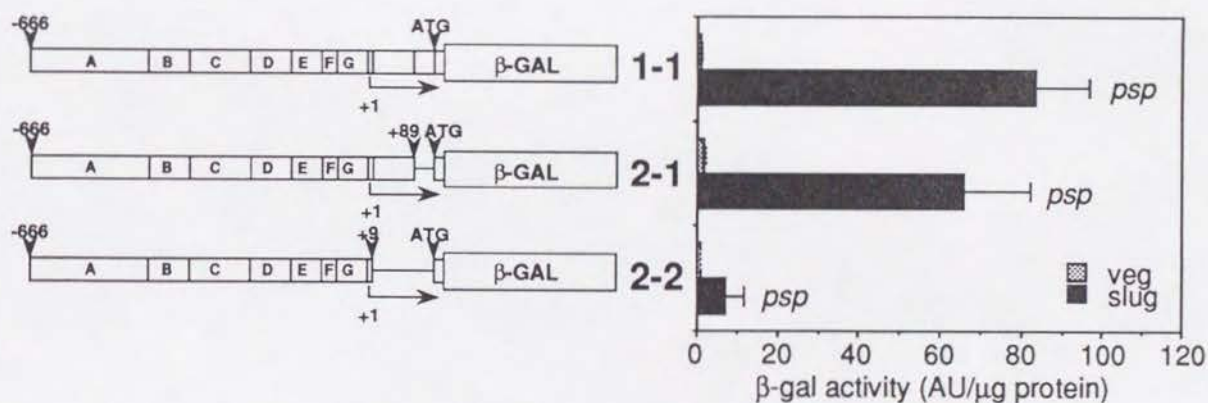


図 8. Dp87遺伝子の5' 上流域を5' 側あるいは3' 側からの削除した場合の予定胞子細胞に特異的な転写に及ぼす影響。(A) 5' 側より削除した変異遺伝子を用いた解析。左側の図において各遺伝子に含まれる5'上流域の範囲を転写開始点を+1とした相対位置で示している。影をつけた領域は以前の解析において同定されたシス領域(領域B)を示す。各形質転換体での増殖期および移動体期におけるβ-gal活性を右のグラフに示す。それぞれの値は形質転換体1-1の増殖期における活性を1とした相対値で表している。各形質転換体について6回の実験を行ない、その平均値を図示し、標準偏差を細線で示している。それぞれの形質転換体でのX-galによる染色パターンをそれぞれのグラフ上の斜線で示す。psp, 予定胞子細胞領域が染色される; none, 移動体の全般にわたって染色がみられない。(B) 3' 側より削除した変異遺伝子を用いた解析。図中の表記は図8Aと同様である。

C

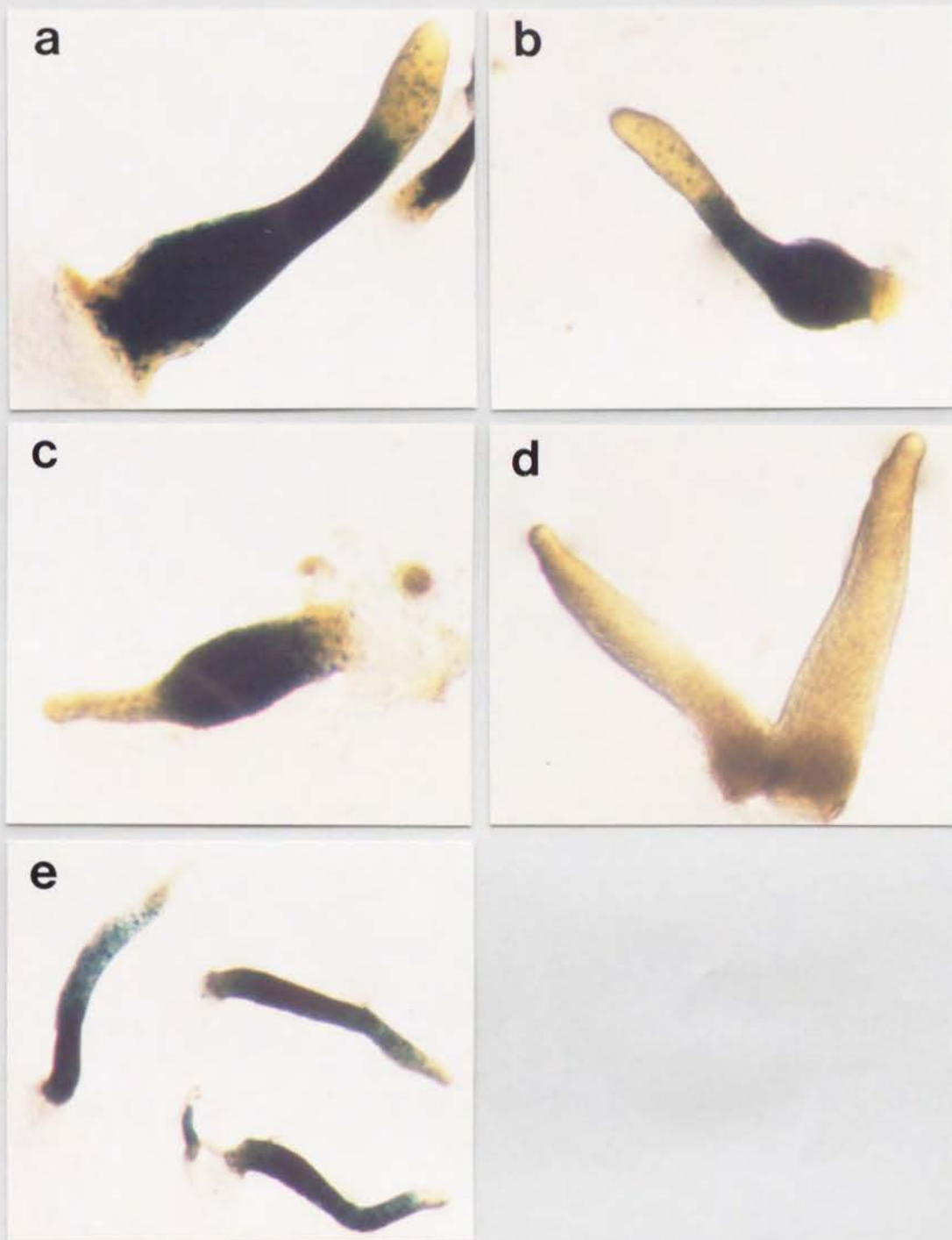


図 8 (続き) . (C) 移動体における X-gal 染色パターン。変異遺伝子を導入した移動体を第 2 章に述べられている様な方法で X-gal 染色した。(a) 形質転換体 1-1 ; (b) 形質転換体 1-2 ; (c) 形質転換体 1-3 ; (d) 形質転換体 1-4 ; (e) 形質転換体 2-2。

内部欠失および外来DNA断片の挿入による-666~-63領域の解析

-349より下流の領域が予定胞子細胞特異的な転写に関与しているかどうかを調べるために、図9にみられる様な内部欠失遺伝子および5'上流域の1箇所に短い外来DNA断片を挿入した挿入変異遺伝子を作製し、それについて解析を行なった。

内部欠失の実験の結果は以下の様にまとめられる。領域B (-432~-350)、C (-349~-231)あるいはD (-231~-158)を単独で削除した場合、各形質転換体での移動体期における β -gal活性は基本となる-666~+149の領域を持つもの(形質転換体1-1)に比べ低い活性を示した。しかし、予定胞子細胞特異的な発現パターンは保たれていた(図9A, 形質転換体3-1・3-2・3-3)。また、これらの形質転換体では全て予定胞子細胞領域内で均一な発現パターンを示した(図9C-b・c・d)。一方、領域CおよびDを同時に削除するともはや移動体期における β -gal活性の上昇が見られなくなった(図9A, 形質転換体3-4)。これらのことおよび5'側からの欠失による解析結果から、-666~-158領域は少なくとも領域A・B・C・Dの4つの正の転写調節領域に分けられること、領域C・Dのいずれか一方が予定胞子細胞特異的な転写に必要であることが示唆された。しかし、領域C・Dの削除によって上流側の調節領域(領域A・B)と-157より下流の領域との間で正常な位置関係がとれなくなったため、移動体期での転写の活性化が起こらなくなかった可能性も否定できない。

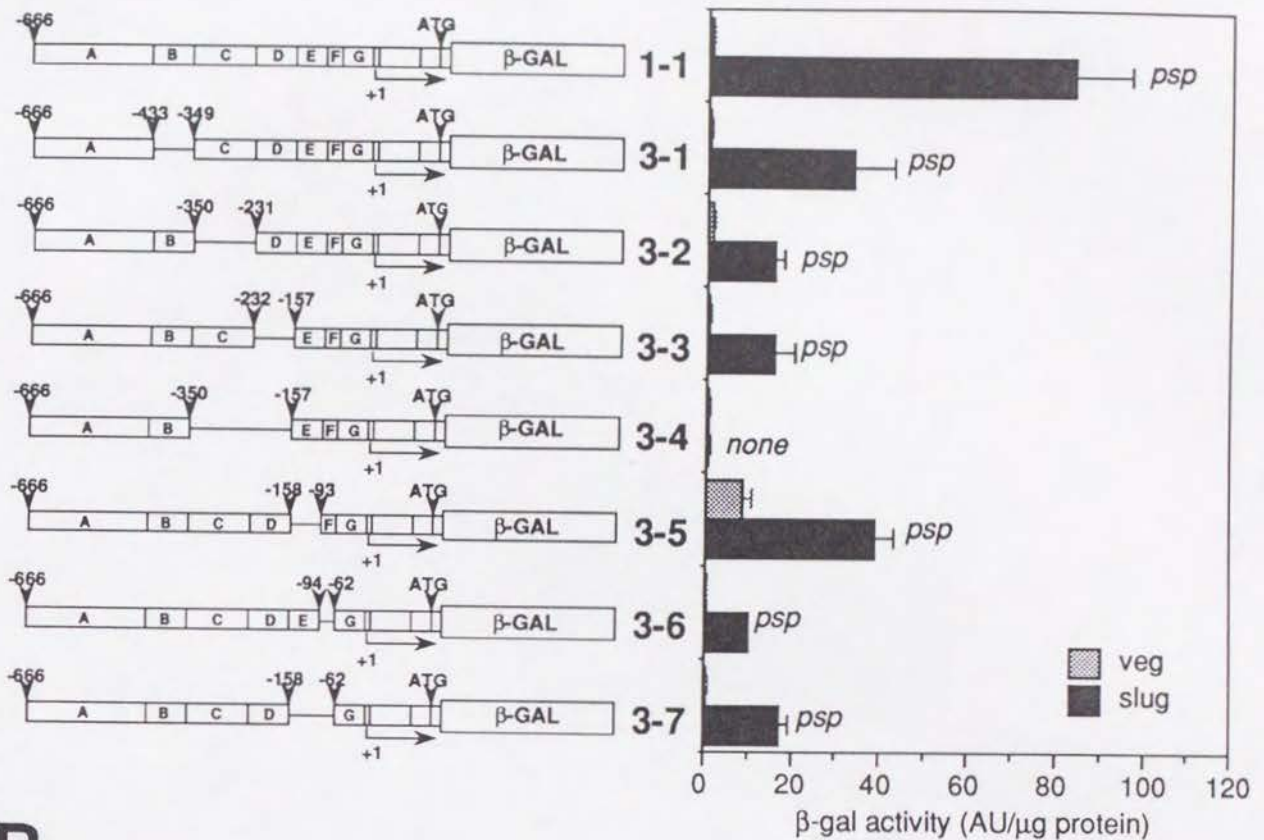
次に、領域E (-157~-94; 図7)を削除すると、移動体期における予定胞子細胞特異的な転写に影響は見られなかったが、増殖期において有意な β -gal活性の上昇が見られた(図9A, C-e, 形質転換体3-5)。このことは、領域Eに増殖期において負の転写調節をおこなう領域が存在することを示唆している。一方、領域F (-93~-63; 図7)を欠失すると移動体期における β -gal活性は著しく下がった(図9A, 形質転換体3-6)。この結果は、領域Fに予定胞子細胞において正の転写調節を行う領域が含まれていることを示唆している。ここで領域E・Fを同時に削除すると、形質転換体3-5で見られた様な増殖期における β -gal活性の上昇が見られなかった(図

9 A・C-f, 形質転換体3-7)。これは、領域Fを欠いたために転写活性が減少し、増殖期における領域Eの効果が見られなかったためと考えられる。このことは領域Fが予定胞子細胞のみならず、増殖期の細胞においても正の転写調節を行っていることを示唆している。また、領域E・Fを同時に削除した場合、正の調節領域A～Dが存在するにもかかわらず増殖期での発現が見られなかったことから、領域A～Dは増殖期において転写を促進できないこと、つまり、これらの領域が予定胞子細胞特異的な正の調節領域であることを示唆している。

次に、大腸菌のベクタープラスミドpBluescript IIのクローニング領域由来の10～20bpのDNA断片を種々の部域に挿入した変異遺伝子を用いて行なった実験結果を示す(図9 B)。-350(領域B～C間)、-231(領域C～D間)および-158(領域D～E間)にDNA断片を挿入した場合、移動体期においてDNA断片を挿入していない形質転換体1-1よりも β -Gal活性の低下が見られたが、予定胞子細胞特異的な転写を示した(図9 B, 形質転換体4-1・4-2・4-3, 形質転換体4-3の染色パターンを図9 C-gに示す)。一方、-94(領域E～F間)あるいは-63(領域F～G間)への挿入変異遺伝子を用いた場合、移動体期における予定胞子細胞特異的な転写がみられた上に新たに増殖期においても高い β -Gal活性が見られた(図9 B, 形質転換体4-4・4-5; 形質転換体4-5の染色パターンを図9 C-hに示す)。

以上の挿入実験の結果はDp87遺伝子は増殖期において発現が負に調節されており、その調節を司る領域は領域E・F・Gにまたがって存在するか、あるいは、領域E・F・Gが正しい距離間隔で配列している必要があることを示唆している。しかし、領域Fを内部欠損させても増殖期における負の調節が見られたことから、後者の方がより可能性が高いと考えられる。

A



B

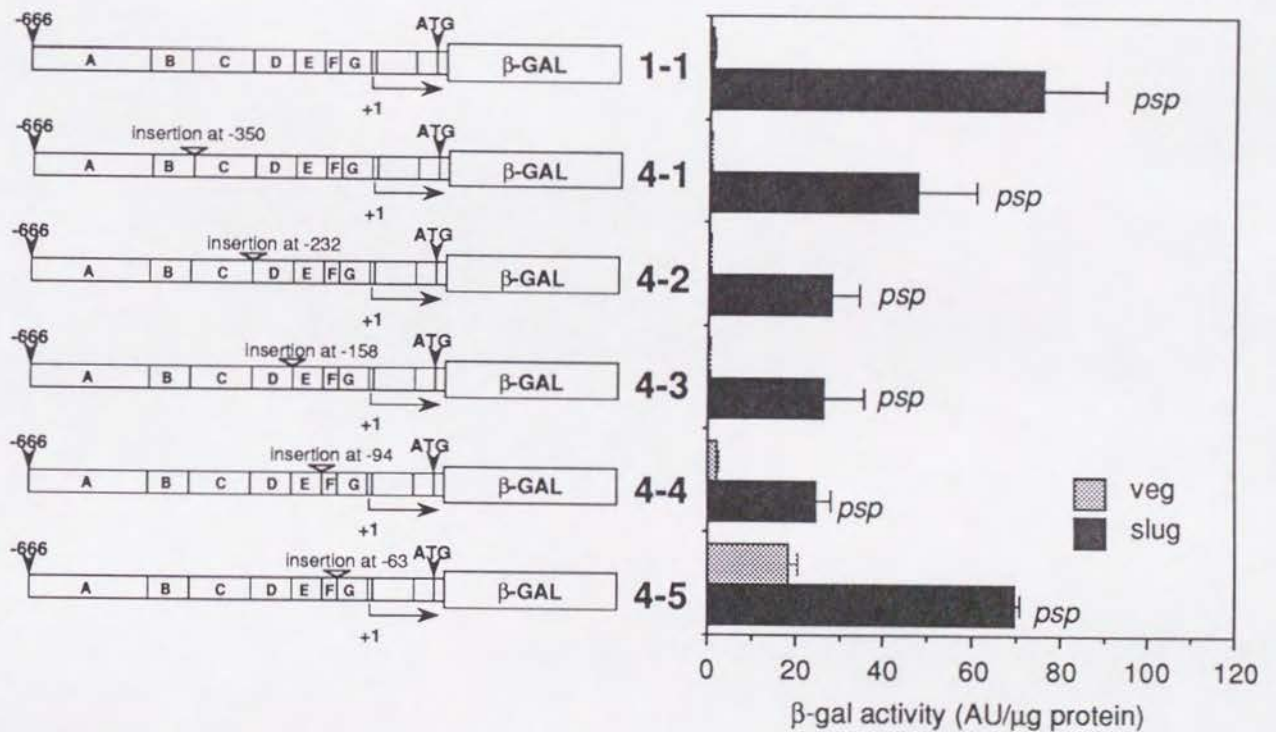


図9. 内部欠失変異体および短い外来DNA断片の挿入による解析。(A) 内部欠失変異体による解析。それぞれの変異遺伝子において欠失している領域を線で示す。(B) 短い外来DNA断片の挿入による解析。それぞれの変異遺伝子における挿入部位を示す。(A)、(B)の形質転換体における β -gal活性の表記は図8と同様である。

C

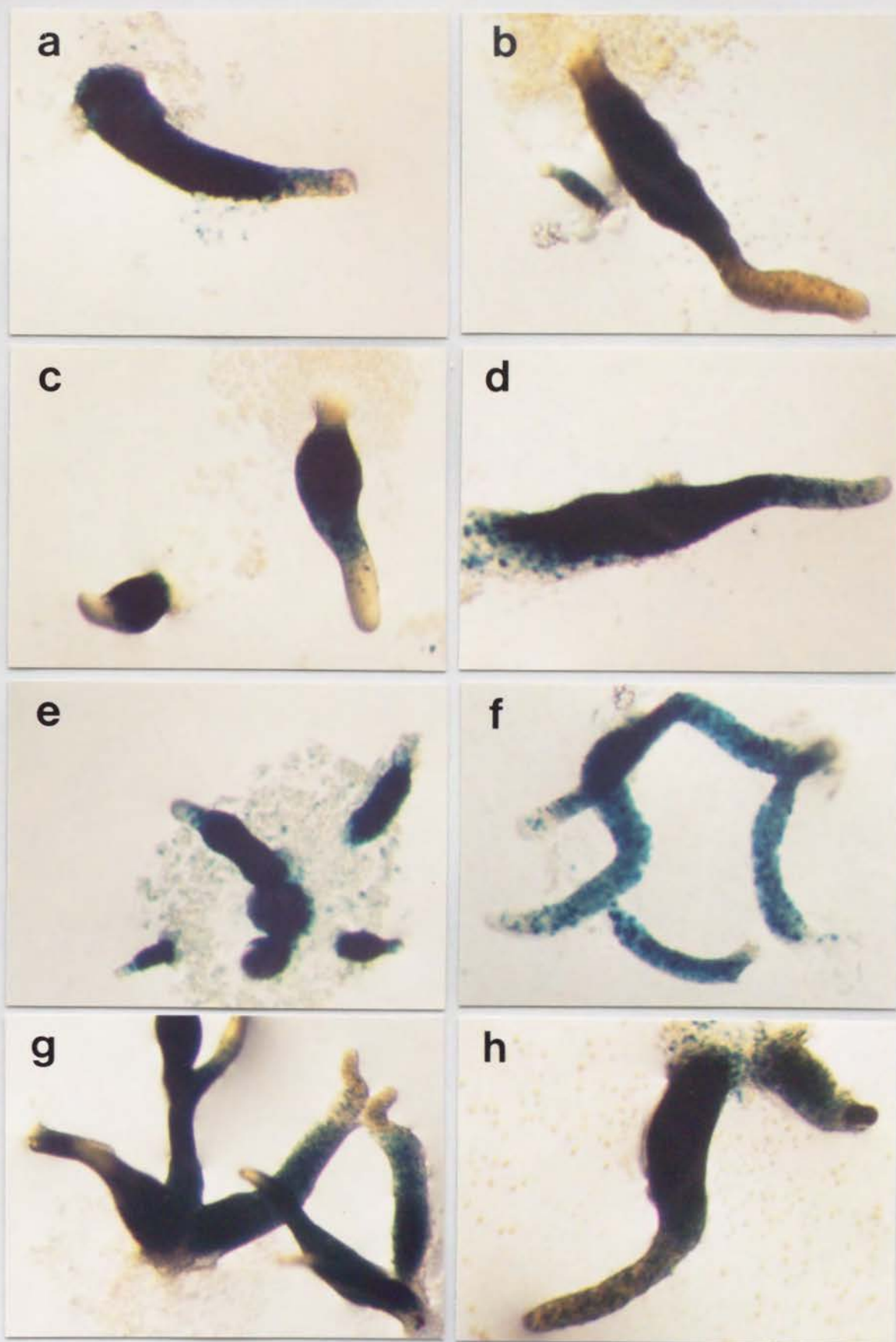


図 9 (続き) . (C) 移動体におけるX-gal染色パターン。(a) 形質転換体1-1 ; (b) 形質転換体3-1 ; (c) 形質転換体3-2 ; (d) 形質転換体3-3 ; (e) 形質転換体3-5 ; (f) 形質転換体3-7 ; (g) 形質転換体4-3 ; (h) 形質転換体4-5。

領域EおよびFの予定柄細胞における働き

領域EおよびFの予定柄細胞における働きを調べるために、粘菌アクチン6遺伝子の5'上流域からTATA boxおよび転写開始点を含まない領域(-680~-35)をDp87遺伝子の領域Gのみか領域F-Gあるいは領域E-F-Gにつないで粘菌細胞に導入した(Nellen et al., 1986)。ここで用いた粘菌アクチン6遺伝子の発生過程での発現は増殖期からみとめられ、発生開始直後には発現量がピークに達し、その後減少する。そして、この遺伝子のmRNAは予定柄細胞に偏って存在することが知られている(Mehdy et al., 1983; Romans et al., 1985)。

図10Aで見られるように、領域F-Gを含む形質転換体5-2は増殖期で形質転換体5-1より高い β -Gal活性を示した。一方、領域E-F-Gを含む形質転換体5-3は形質転換体5-1よりも低い β -Gal活性を示した。この結果は、前節で示した領域FおよびEが増殖期でそれぞれ正および負の調節に関与するという結果を支持している。

それぞれの形質転換体は、増殖期から発生期に入ってもこれまで見られたような β -Gal活性の上昇が見られず、むしろ増殖期より低下した。また、これらの形質転換体の移動体をX-gal染色すると全ての形質転換体において移動体の全域で染色が認められた(形質転換体5-1の染色パターンを図10Bに示す)。ここで見られる β -Gal活性およびX-galによる染色パターンは、増殖期に発現した β -Galタンパク質が移動体期まで残存した結果である可能性が考えられる。そこで移動体期における転写量および細胞型特異的発現を調べるために、これらの形質転換体の予定胞子細胞および予定柄細胞より全RNAを抽出し、ノーザン解析により β -GalおよびDp87遺伝子のmRNA量を調べた。図10Cで示す様に、いずれの形質転換体でも予定柄細胞にのみ β -Gal遺伝子のmRNAの存在がみとめられ、予定胞子細胞画分にはほとんど検出されなかった。このmRNAの存在様式はDp87遺伝子のmRNAの存在様式とは逆で、むしろアクチン6遺伝子のmRNAのそれと同等であった。また、形質転換体5-2では形質転換体5-1の場合より高いレベルでmRNAが存在し、形質転換体5-3では形質転換体5-1よりも低いレベルのmRNAが検出された。

以上の結果は、領域EおよびFが予定柄細胞においてもそれぞれ負および正の転写調節を行うことを示唆している。

A

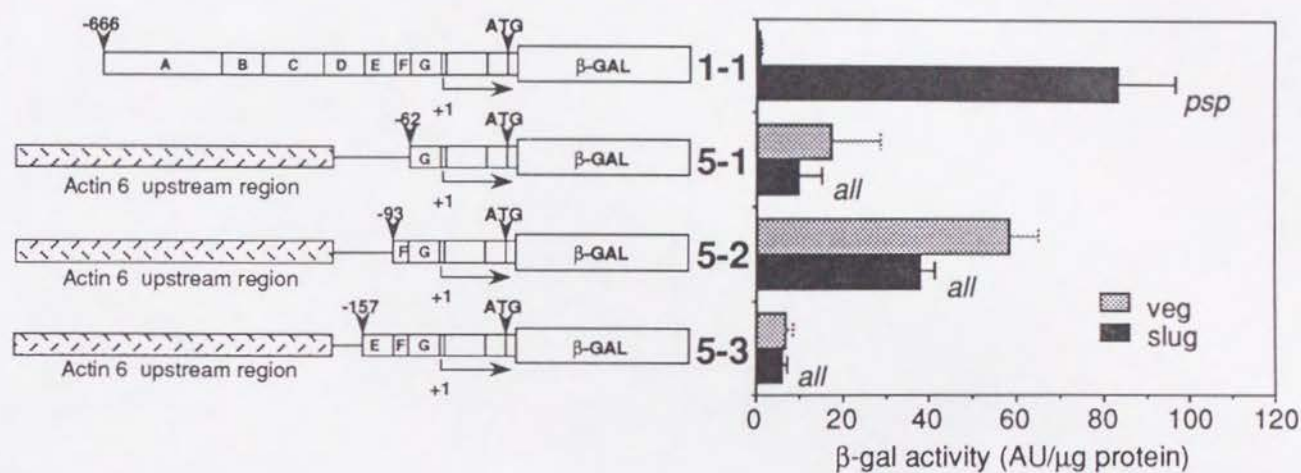
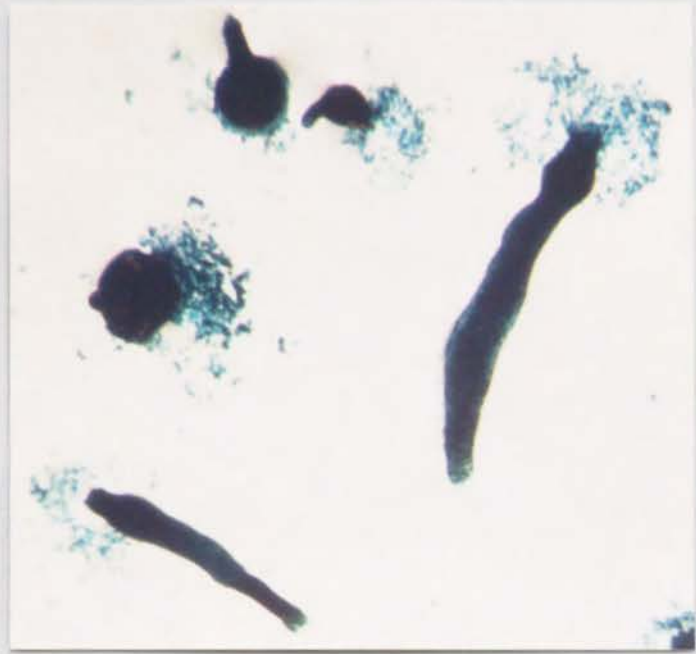


図10. 領域E・Fの予定柄細胞における機能の解析。(A) 各形質転換体における増殖期・移動体期での β -gal活性の推移。TATA box配列および転写開始点を含まない粘菌アクチン6遺伝子の5'上流域をDp87遺伝子の5'上流-157・-93・-62につないだキメラ遺伝子を作成した。形質転換体における β -gal活性の表記は図8と同様である。それぞれの形質転換体でのX-galによる染色パターンをそれぞれのグラフ上の斜字で示す。*psp*, 予定胞子細胞領域が染色される; *all*, 移動体の全般にわたって染色される。

B



C

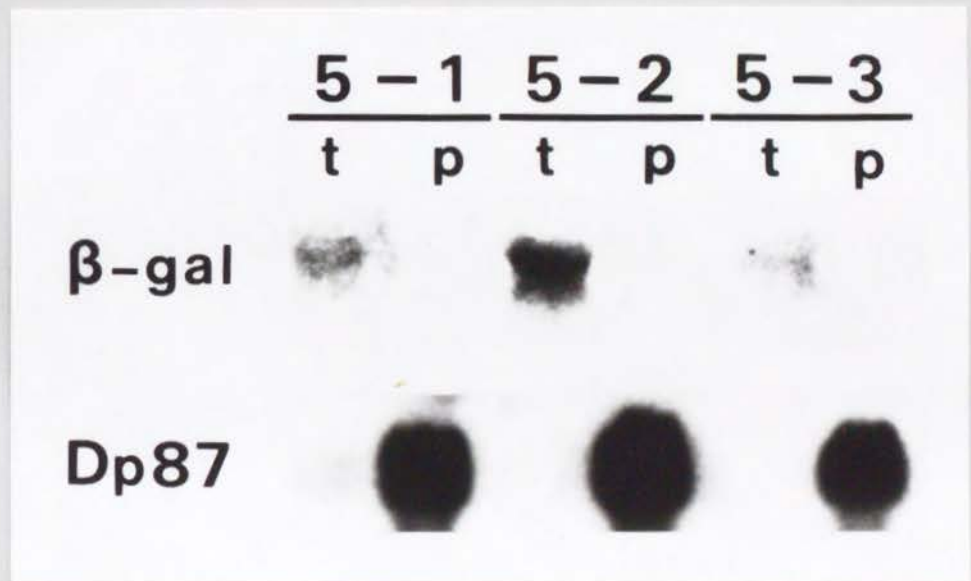


図10（続き）.（B）形質転換体5-1の移動体におけるX-gal染色パターン。（C）移動体における両予定細胞でのmRNAの蓄積。移動体より分離した予定柄細胞（t）および予定胞子細胞画分（p）より抽出した全RNA（10 μ g）をホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル電気泳動により展開した後ナイロンフィルターに移し³²Pで放射標識した β -galあるいはDp87遺伝子コード領域とハイブリダイズさせた。

異なる遺伝子由来のプロモーターに対する領域A～Fの効果

これまでの解析で同定された転写調節領域が異なる遺伝子に対しても予定胞子細胞特異的な転写を引き起こすかどうかを知るために、粘菌アクチン15遺伝子のTATA boxと予想される領域と転写開始点および5' 非翻訳領域を含む約270bpの断片と β -Gal遺伝子をつないだキメラ遺伝子 (A15 Δ Bam β -Gal; 図3 B) の上流に、Dp87遺伝子の-666～-63 (領域A～F) およびその一部を挿入して粘菌細胞に導入した。そして、各形質転換体について増殖期並びに移動体期における β -Gal活性を調べた。

領域A～Fを含む形質転換体6-1では、ベクターA15 Δ Bam β -Galのみを導入した形質転換体6-4に比べ増殖期・移動体期でともに約100倍高い β -Gal活性を示したが、移動体期と増殖期で β -Gal活性に差が見られなかった (図11A)。また、図10Cと同様に移動体におけるmRNAの蓄積パターンを調べると、レポーター遺伝子のmRNAが予定胞子細胞に偏って存在していた (図11C)。レポーター遺伝子のmRNAは、粘菌アクチン15遺伝子の5' 非翻訳領域と β -Gal遺伝子コード領域および粘菌アクチン8遺伝子の3' 非翻訳領域からなり、このレポーター遺伝子のmRNAが予定胞子細胞で特異的に蓄積するのに関係するような塩基配列は一切含まれていない。このことから上記の予定胞子細胞に偏った蓄積パターンは転写後の調節よりもむしろ転写レベルでの調節を反映していることが示唆される。以上の結果から、領域A～Fはアクチン15遺伝子のプロモーターに対しては予定胞子細胞特異的な転写の調節を規定できるが、増殖期での負の調節を行うことが出来ないことを示唆している。

次に、形質転換体6-1で見られた予定胞子細胞特異的な転写が予定胞子細胞特異的な正の調節領域 (領域A～D) によるかどうかを知るために、領域A～D (キメラ遺伝子6-3) あるいは領域A～DおよびF (キメラ遺伝子6-2) をA15 Δ Bam β -Galベクターの上流に挿入して粘菌細胞に導入した。その結果、形質転換体6-3において非常に低いながらもベクターのみの場合に比べて有意な β -Gal活性が増殖期においても移動体期においても検出された (図11A)。すでに領域Fが発生過程に関係なく働く正の調節領域であることが示唆されていたが、形質転換体6-2が形質転換体6-3より

も高い β -Gal活性を示すことからこの結論が正しいことが支持された。移動体におけるmRNAの蓄積パターンを調べると、形質転換体6-2においてmRNAは量が非常に低いながらも予定胞子細胞に偏って蓄積していた。しかし、形質転換体6-3では長時間露光後でもmRNAが検出できなかった。

以上の結果をまとめると、粘菌アクチン15遺伝子由来のプロモーターに対しては、Dp87遺伝子の予定胞子細胞特異的かつ正の調節領域である領域A～Dと発生段階に関係なく働く正の調節領域Fとの協調作用により移動体における予定胞子細胞特異的転写をひきおこすことが出来るが、負の調節領域Eは増殖期における転写の抑制をすることが出来ないことが示された。このことは、Dp87遺伝子のTATA boxおよび転写開始点を含む領域Gが領域Eを介した負の転写調節に必要であることを示唆している。また領域A～Dのみで増殖期に転写が見られる点は今までの実験結果と異なり、このことも領域A～Dの働きに対して領域Gが関与することを示唆している。

A

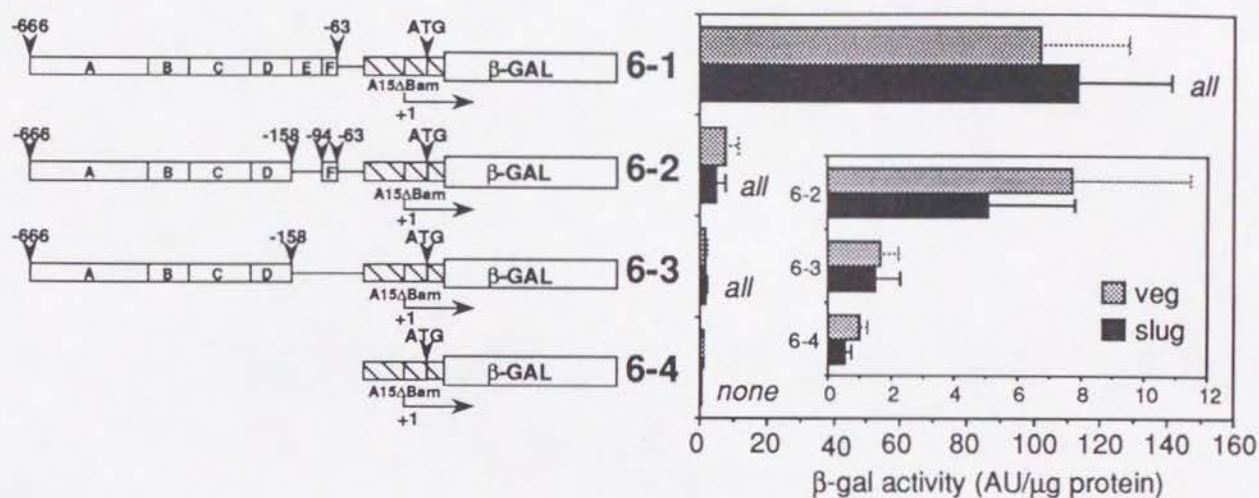
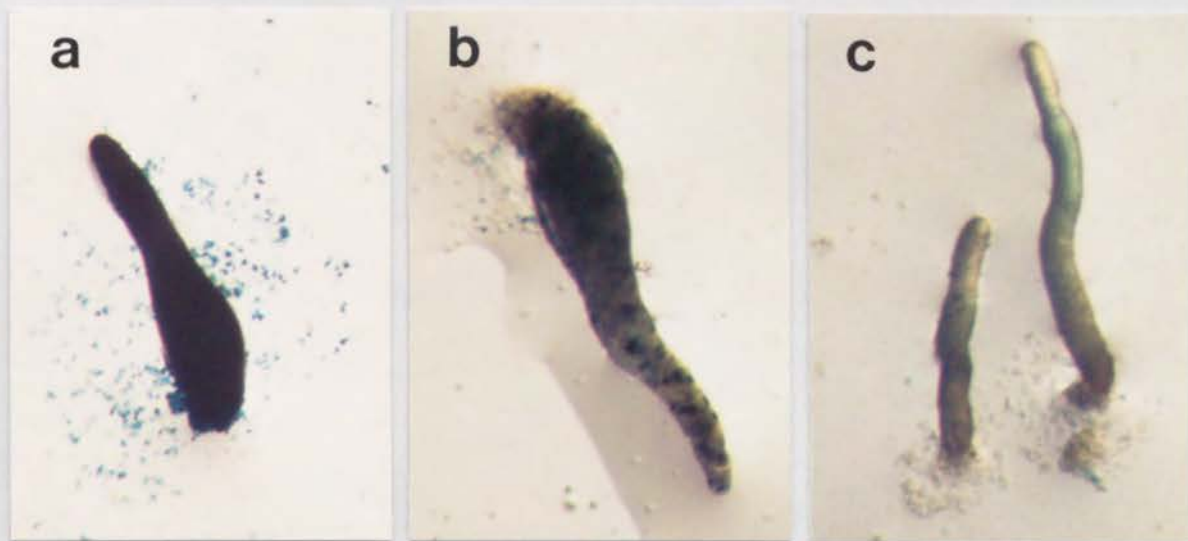


図11. 異なる遺伝子由来のプロモーターに対する領域A～Fの影響。(A)増殖期・移動体期における β -gal活性の推移。Dp87遺伝子の5'上流域のうち図示した異なる部域をアクチン15遺伝子プロモーターと*lacZ*コード領域の遺伝子を持つA15 Δ Bam-galベクターの転写開始点より約100bp上流(図左斜線)に存在するBamHI部位に挿入した。これらの変異遺伝子を持つ形質転換体の増殖期および移動体期における β -gal活性を形質転換体6-4の増殖期での活性を1とした相対値で示している。形質転換体6-4の増殖期での活性は形質転換体1-1の増殖期におけるその約1.3倍である。

B



C

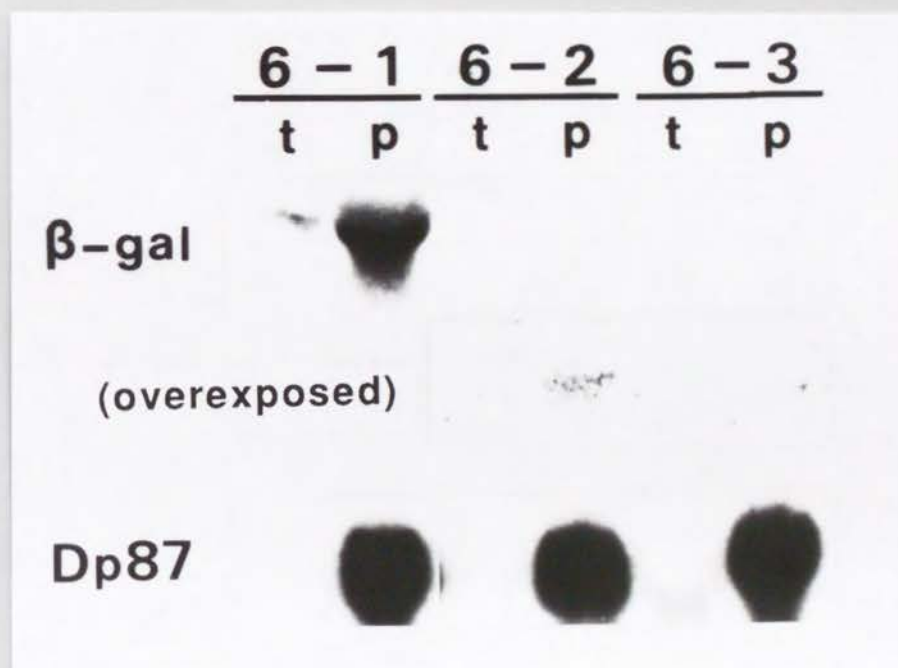


図11 (続き)。(B) 移動体におけるX-gal染色パターン。(a) 形質転換体6-1；(b) 形質転換体6-3；(c) 形質転換体6-4。形質転換体6-3および6-4では、長時間（1～2日）の染色反応をおこなった。(C) 移動体における両予定細胞でのmRNAの蓄積。移動体より分離した予定柄細胞（t）および予定胞子細胞画分（p）より抽出した全RNAについて図10と同様にノーザンハイブリダイゼーションをおこなった。形質転換体6-2および6-3由来のRNAと β -gal遺伝子コード領域とのハイブリダイゼーションについては長時間露光後のオートラジオグラフを下段に示した（overexposed）。

Dp87遺伝子の転写調節領域A・B・Dに結合する核内因子とその部分精製

以上の解析から、Dp87遺伝子の5'上流域には少なくとも3つの機能の異なるシス領域が存在することが示唆された。その中の領域A・B・C・Dは予定胞子細胞に特異的に働く正の調節領域であると考えられる。また、これらの領域はそれぞれ他のいくつかの予定胞子細胞に特異的な遺伝子(*cotA*、*cotB*、*cotC*)の転写調節領域に見いだされるCAに富む配列であるCA-box (ACACCCA)あるいはCACAC配列を含む(図7)。これらの領域に塩基配列特異的に結合する核内因子が存在するかどうかを調べるために、³²Pで放射標識した領域Bを含むDNA断片をプローブとし、増殖期および移動体期の細胞由来の粗核抽出液を用いてゲル移動度シフトアッセイを行なった。図12Aに見られるように、移動体期の細胞由来の粗核抽出液を用いた時にDNA-核内因子複合体が検出されたが、増殖期の細胞由来の核抽出液では複合体が見られなかった。核抽出液をトリプシン処理したり、95℃で5分間の熱処理を行なうとこの複合体が形成されないことから、この核内因子はタンパク質を重要な構成成分として含むものと考えられる(図12B)。

次に、この複合体が塩基配列特異的に形成されるかどうかを調べるために、領域Aの一部(-506~-432; 領域A1)と領域B、C、D、EおよびGをそれぞれ含むDNA断片を競合体として反応系に加えた。領域A1、B、Dを競合体として用いた場合は、50~200倍のモル量を加えたときに複合体形成が抑えられた(図12C)。領域Cを用いた場合、加える量を増加させるに従って検出される複合体量は減少するが、200倍加えたときにも複合体が検出された。一方、領域EあるいはGを加えても複合体形成にほとんど影響が見られなかった。これらの結果から、移動体の核内に予定胞子細胞で特異的に働く正の調節領域Bに塩基配列特異的に結合する因子が存在すること、さらにこの因子は領域A、Dにも結合し、領域Cに対しては弱い結合活性を持つことが示唆された。

この因子が領域B内のどの配列を認識するかを調べるために領域Bを3つのDNA断片に分割して、それらを用いて複合体形成の競合実験を行なった(図13A)。領

域B1とB2を競合体とした場合、モル比にしてそれぞれ50倍ないし100倍過剰量を加えたときに、もともと形成されていた塩基配列特異的なDNA-核内因子複合体（複合体C1）が消失した（図13B）。さらに、複合体C1の消失に伴って新たなより移動度の速い複合体C2が現れた。一方、領域B3を100倍加えたときにも、かすかながら複合体が検出された。これらの結果は、この核内因子は領域B1とB2の2箇所の塩基配列と相互作用することを示唆している。この領域B1およびB2にはすでに述べた特徴的な配列であるCA-box（ACACCCA）配列が含まれている（図13A）。すでに領域Bをプローブとしたゲル移動度シフトアッセイにおいて、*cotA*遺伝子のCA-boxを含む転写調節領域のDNA断片を競合体として用いると特異的なDNA-核内因子複合体形成が阻害されることが明らかになっている（Tasaka, 1991）。

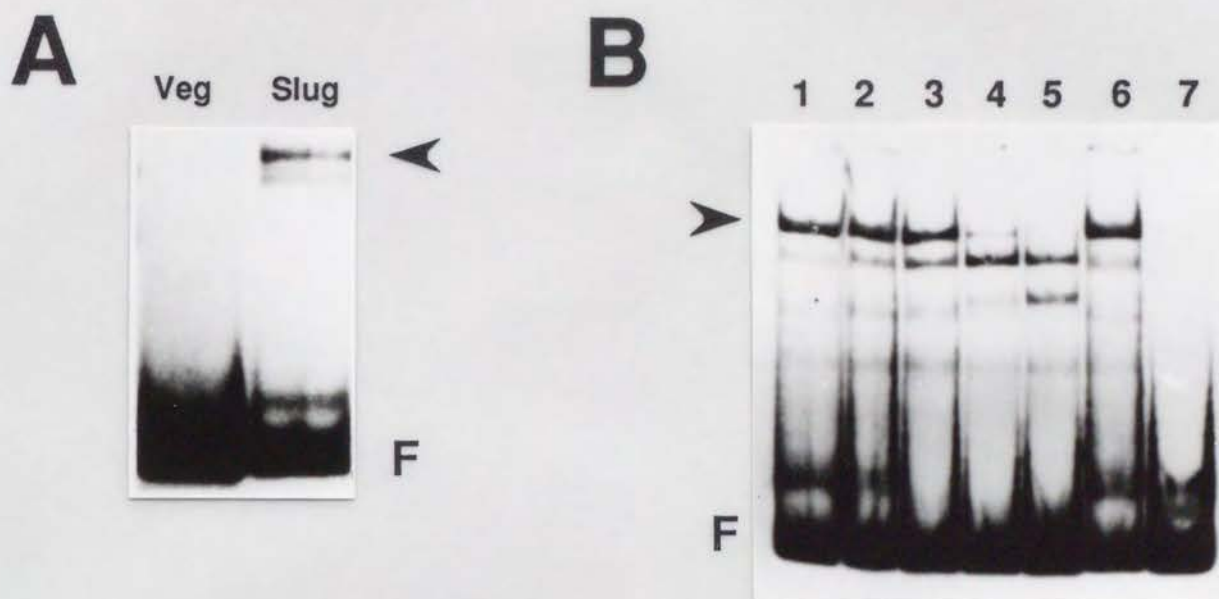


図12. 領域Bに特異的に結合する核内因子。(A) 発生過程におけるDNA-核内因子複合体の形成。 ^{32}P で放射標識した領域BのDNA断片をプローブに、増殖期(Veg)・移動体期(Slug)の細胞より調整した粗核抽出液を用いてゲル移動度シフトアッセイを行なった。Fは核内因子と複合体を作らなかったプローブDNA断片の泳動位置を示す。DNA-核内因子複合体の泳動位置を矢じりで示す。(B) トリプシンあるいは熱処理のDNA-核内因子複合体形成に対する影響。核抽出液を0ng(レーン1)・10ng(レーン2)・100ng(レーン3)・500ng(レーン4)・1000ng(レーン5)のトリプシン処理、あるいは4℃(レーン6)・90℃(レーン7)5分間の熱処理を行なった後DNA-核内因子複合体形成反応を行ない電気泳動した。(C) DNA-核内因子複合体形成の塩基配列特異性。レーン上に示した領域のDNA断片を競合体としてモル比にして10~200倍量加えDNA-核内因子複合体形成反応を行なった。(一)は競合体を加えない場合を示す。Fは核内因子と複合体を作らなかったプローブDNA断片の泳動位置を示す。矢じりは目的とするDNA-核内因子複合体の泳動位置を示す。

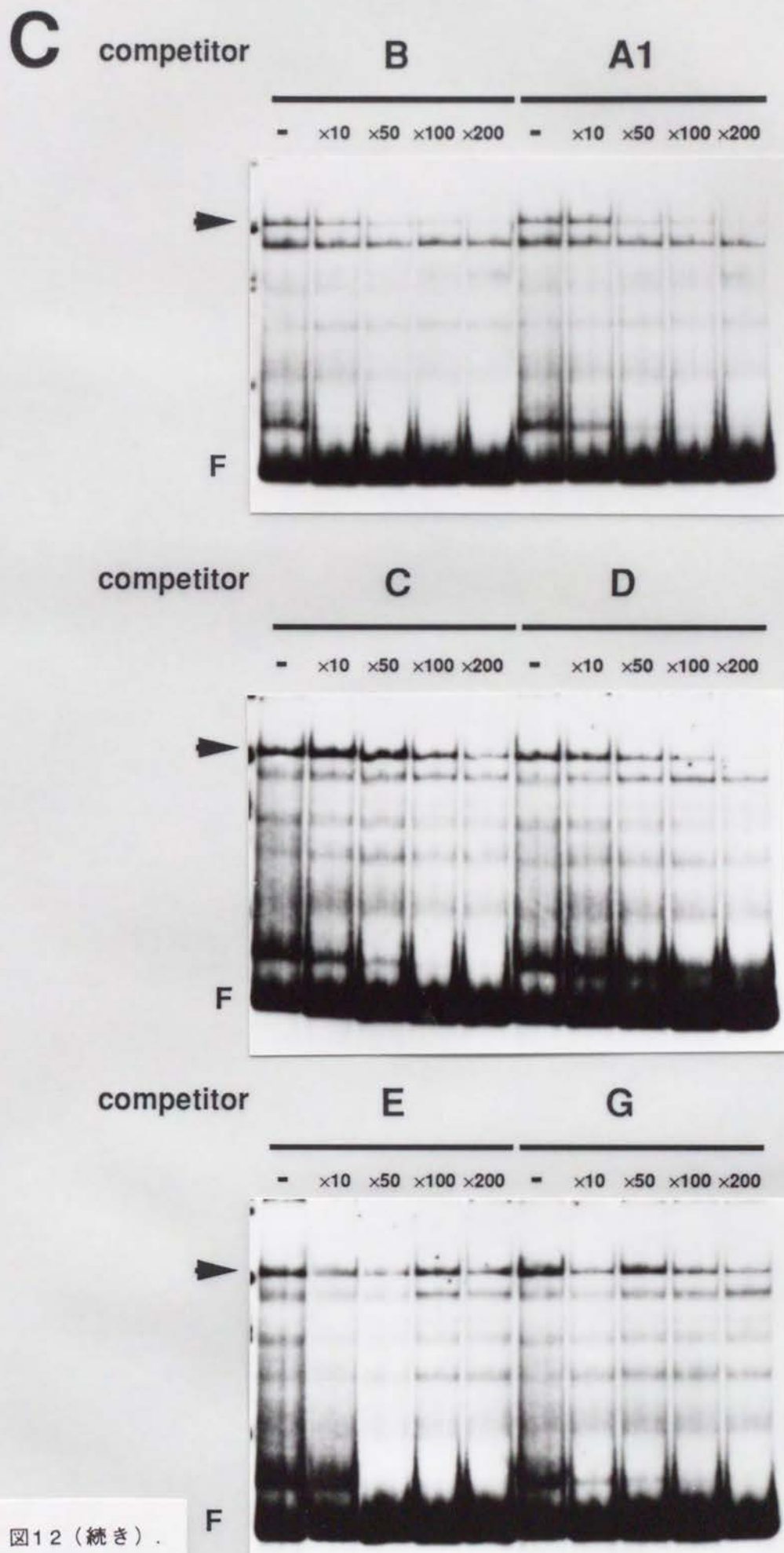


図12 (続き) .

A

-432

-350

ACTTCATTACACCCACAATAACACATATACACCCTAGACTTTTACAATTACCAATTATATTTATTCAAAT
TGAAGTAATGTGGGTGTTATTGTGTATATGTGGGATCTGAAAAATGTTAATGGTTAATGTAAATAAGTTA

B1

B2

B3

B

B1

B2

B3

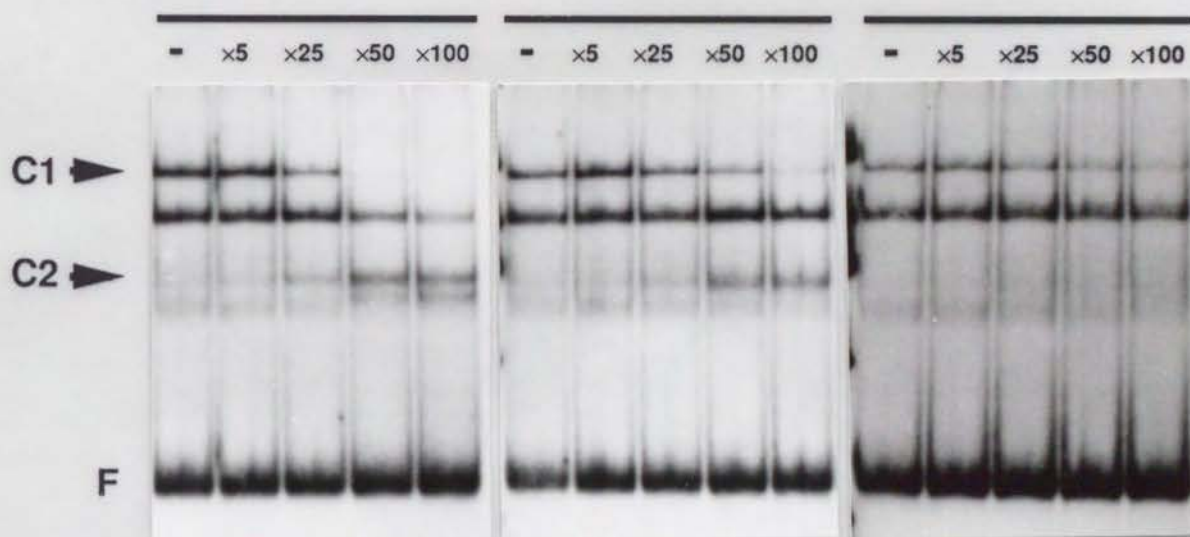


図13. 領域Bに特異的に結合する核内因子の塩基配列特異性。(A) 競合体DNAの塩基配列。領域BをB1・B2・B3の3つの部域に分け、それぞれに対応する2本鎖DNAを合成した。(B) 競合体DNAのDNA-核内因子複合体形成に対する影響。 ^{32}P で放射標識した領域BのDNA断片をプローブに、移動体期の細胞より調整した粗核抽出液を用いてモル比にして5~100倍量のB1~B3競合体DNA存在下でゲル移動度シフトアッセイを行なった。レーン上の(-)は競合体を加えない場合を示す。Fは核内因子と複合体を作らなかったプローブDNA断片の泳動位置を示す。DNA-核内因子複合体の泳動位置をC1・C2で示す。

次に、この核内因子についての詳細な解析を行なうためにこの因子の部分精製を試みた。まず、DNA結合タンパク質に対して親和性を持つHeparinに対するアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行なった。移動体期の細胞から調製した細胞核抽出液をKCl非存在下でHeparin-Sepharoseカラムに通し、緩衝液IIIで洗浄した後、0.2M、0.4M、0.5M KClを含む緩衝液IIIで順次溶出した（図14A；第2章参照）。図14Bに見られる様に、0.4M KCl溶出画分にのみ求めるDNA-核内因子複合体が検出された。粗核抽出液の場合と同様にこの複合体は領域B1に対しては形成されたが領域Gに対しては形成されなかった（図14C）。

この核内因子が領域B1とB2の塩基配列と結合することが示唆され、しかも、それぞれにCA-boxが存在することから、領域B1とB2のCA-box配列を含むDNA断片を用いてDNAアフィニティークロマトグラフィーを試みた。13bpからなる合成二本鎖DNA断片（B1-CA、AATTCACACCCACAATAAG；B2-CA、AATTCACACCCTAGACTTG）を数個連結し、活性化されたCNBr基を持つSepharoseビーズに結合してアフィニティー担体とした。KClを含まない緩衝液IIIで透析したHeparin-Sepharose 0.4M KCl溶出画分をこのアフィニティークラムに通し、緩衝液IIIで洗浄した後、0.2M、0.5M、1.0M KClを含む緩衝液IIIで順次溶出した（図15A）。図15Bで見られるように0.5M KCl溶出画分に求めるDNA-核内因子複合体が検出された。この画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動すると、銀染色で十数本のバンドが検出されたが、ここで得られた画分のDNA結合活性は非常に不安定なため、これ以上の精製を行なうことは出来なかった（図15C）。

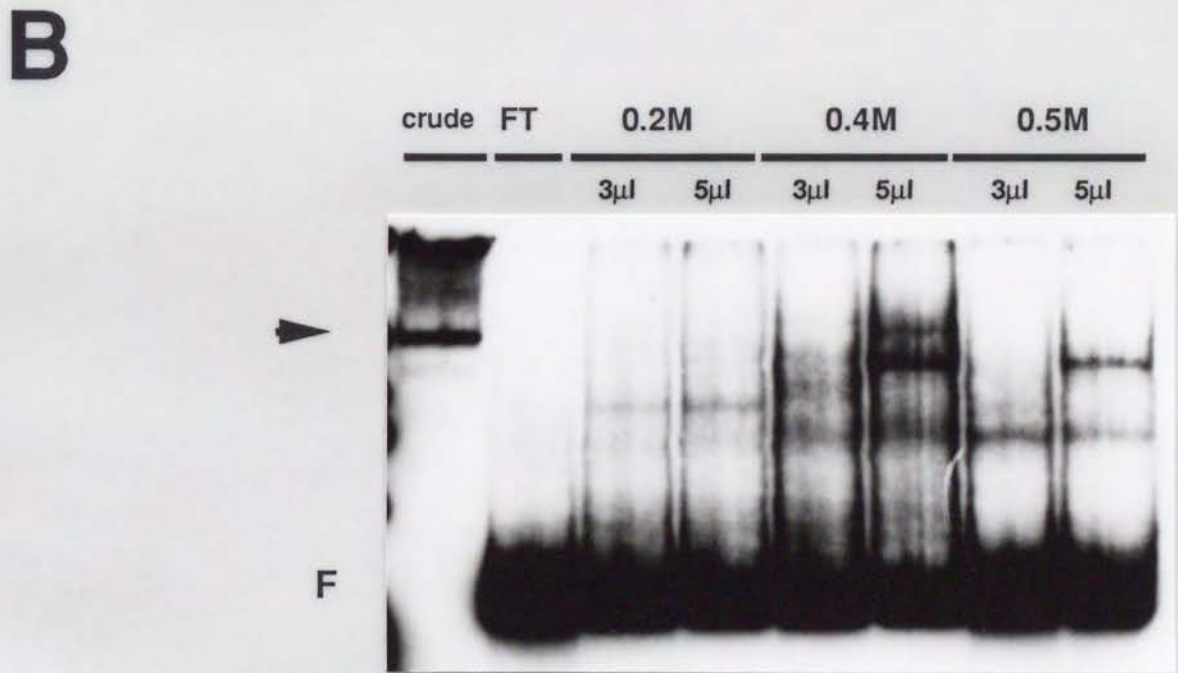
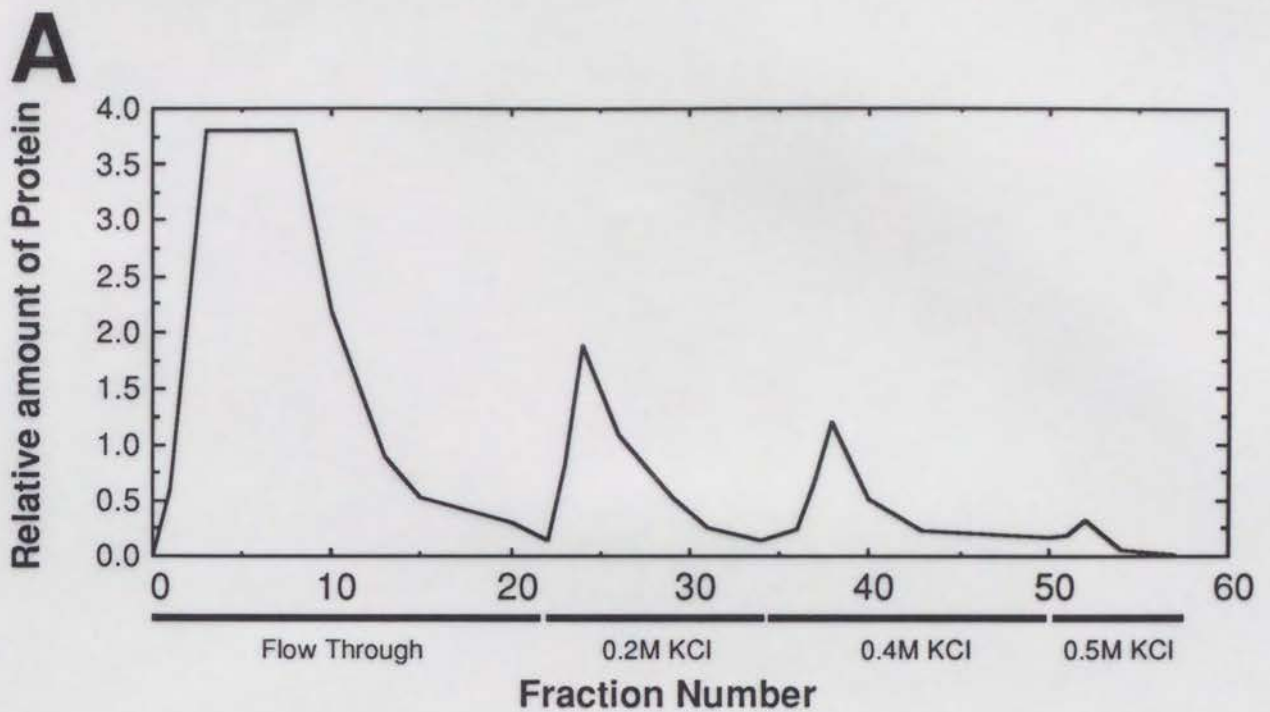


図14. Heparin-Sepharoseカラムクロマトグラフィーによる領域Bに結合する核内因子の部分精製。

(A) Heparin-Sepharoseカラムクロマトグラフィーのプロフィール。各画分 (700 μ l) のタンパク量はBradford法による波長595nmでの吸光度で表している。(B) それぞれのKCl濃度での溶出画分におけるDNA-核内因子複合体形成能。 32 Pで放射標識した領域BのDNA断片をプローブに、カラムに結合しなかった画分 (FT) および各KCl濃度での溶出画分を用いてゲル移動度シフトアッセイを行なった。Fは核内因子と複合体を作らなかったプローブDNA断片の泳動位置を示す。DNA-核内因子複合体の泳動位置を矢じりで示す。

C

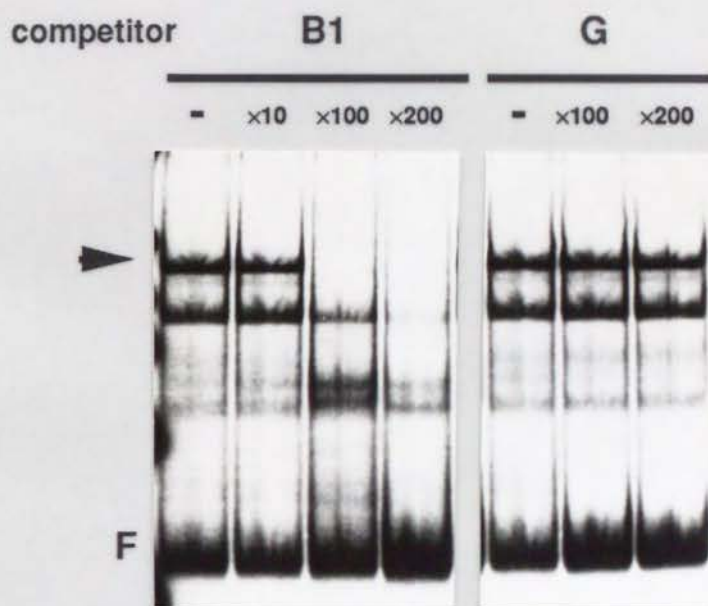


図14(続き)。(C) 0.4M KCl溶出画分におけるDNA-核内因子複合体の塩基配列特異性。 ^{32}P で放射標識した領域BのDNA断片をプローブに、0.4M KCl濃度での溶出画分を用いてモル比にして10~200倍量の領域B1あるいは領域G競合体DNA存在下でゲル移動度シフトアッセイを行なった。レーン上の(ー)は競合体を加えない場合を示す。

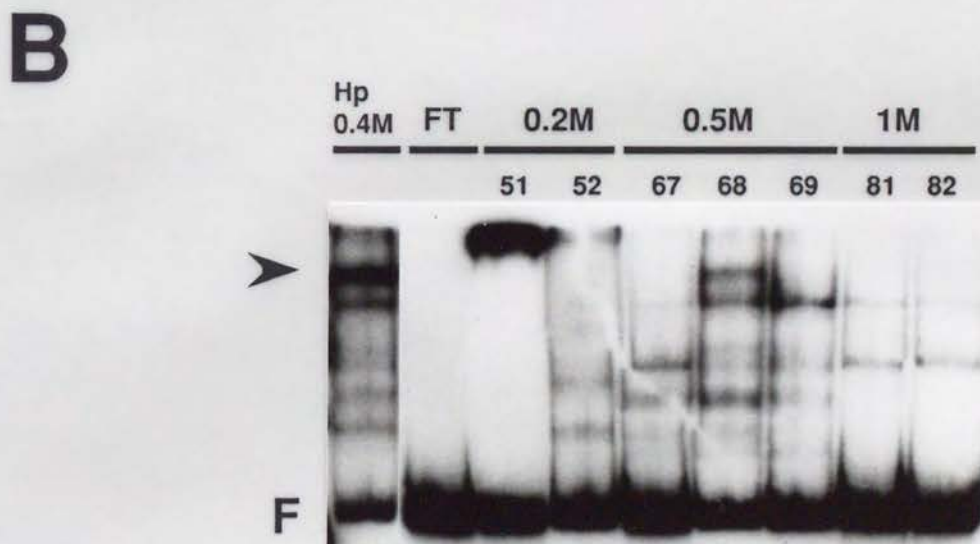
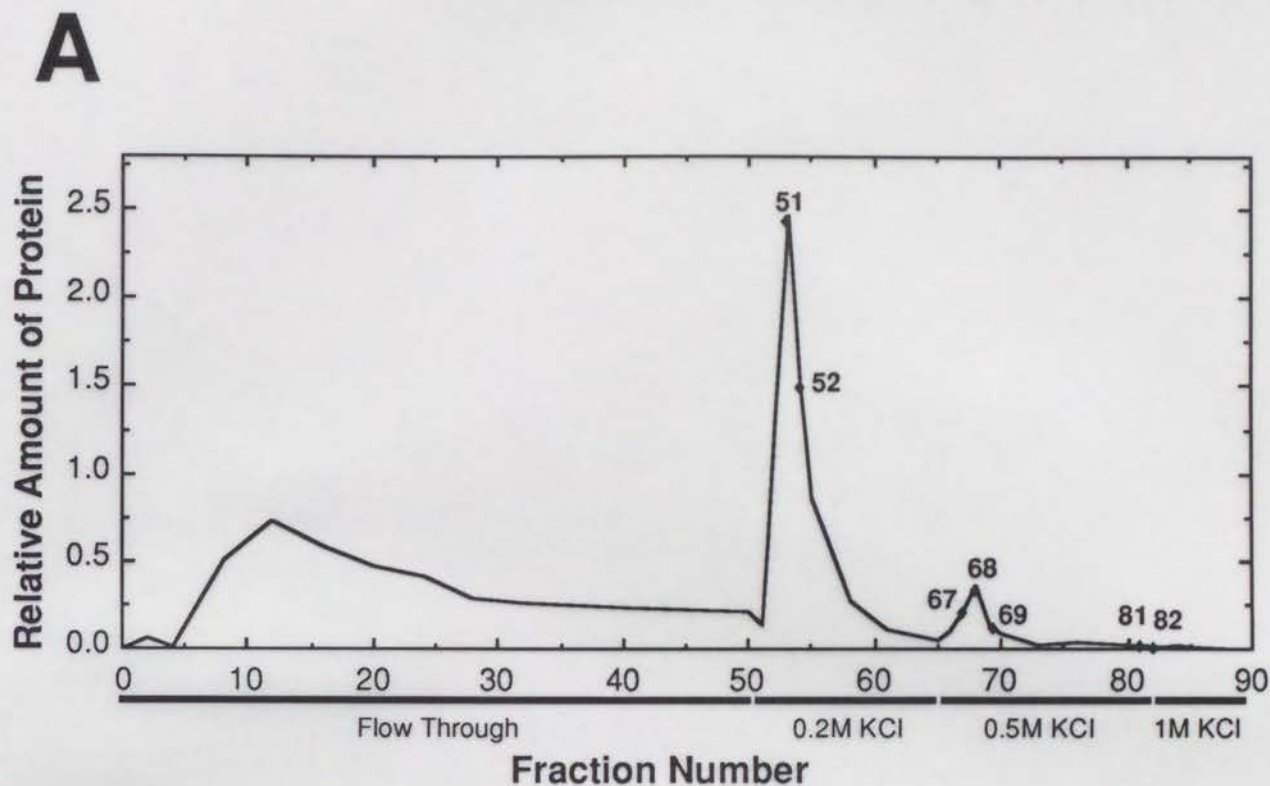


図15. DNAアフィニティーカラムクロマトグラフィーによる領域Bに結合する核内因子の部分精製。
 (A) DNAアフィニティーカラムクロマトグラフィーのプロフィール。各画分 (400 μ l) のタンパク量はBradford法による波長595nmでの吸光度で表している。(B) それぞれのKCl濃度での溶出画分におけるDNA-核内因子複合体形成能。 32 Pで放射標識した領域BのDNA断片をプローブに、カラムに結合しなかった画分 (FT) および各KCl濃度での溶出画分を用いてゲル移動度シフトアッセイを行なった。Fは核内因子と複合体を作らなかったプローブDNA断片の泳動位置を示す。DNA-核内因子複合体の泳動位置を矢じりで示す。

C



図15（続き）．（C）各精製段階の溶出画分におけるタンパク質組成。粗核抽出液（C）・Heprin-Sepharose 0.4M KCl溶出画分（Hp）・DNAアフィニティーカラム0.5MKCl溶出画分（Affinity, 画分68・69）を10% SDSポリアクリルアミド電気泳動で展開した後、ゲルを銀染色した（Oakley et al., 1980；Morrissey, 1981）。

第5章 結論と考察

第3章では細胞性粘菌においてmRNAの蓄積が細胞型に特異性を示すいくつかの遺伝子について、さまざまな発生過程の細胞や分離した両予定細胞画分由来の単離細胞核を用いてrun-on assayを行なうことで遺伝子の転写パターンを解析した。この結果、これらの遺伝子はmRNAの蓄積パターンと転写パターンの比較より2つのグループに分けられた。

第一のグループの遺伝子は、発生過程での転写パターンと転写の細胞型特異性が共に mRNAの蓄積パターンと一致するものであった。これはmRNAの蓄積の調節がおもに転写レベルの調節によることを示している。このグループには予定胞子細胞に特異的な遺伝子 Dp87や*cotA*及び予定柄細胞に特異的な遺伝子*ecmA*や*ecmB*が含まれる。これらの遺伝子は乳頭突起形成期前後から一方の予定細胞でのみ転写が行なわれ、その結果としてmRNAの特異的な蓄積が起これと考えられる。これらDp87、*cotA*、*ecmA*、*ecmB*の各遺伝子は細胞の分化にともなって新たに転写が開始することから、両予定細胞の分化のマーカーとして有用であり、これらの遺伝子の細胞型特異的な転写の調節機構を解明することが細胞分化を分子レベルで理解する上で非常に重要である（図4，図5）。

第二のグループの遺伝子は、発生過程において転写パターンとmRNAの蓄積パターンが一致しているが、移動体においてどちらかの細胞にmRNAが偏って存在するにもかかわらず両方の予定細胞ではほぼ同じように転写されているものである（図5）。この結果は、これらの遺伝子由来のmRNAが細胞型に特異的に蓄積するために転写後の調節が大きく関与していることを示唆している。もっとも、両予定細胞における転写量の微妙な違いが積算されることにより細胞型に特異的な蓄積が実現された可能性も否定できない。このグループの遺伝子は更に2つのサブクラスに分けられる。ひとつは増殖期から発生過程を通じて転写されるもので、もうひとつは発生後期より転写されるものである。前者に含まれる遺伝子DdEF2、Dp28、Dp34のmRNA

は移動体において予定胞子細胞に多く蓄積するにも関わらず両方の予定細胞における転写量に差がほとんど認められないか、むしろやや予定柄細胞に偏った転写が見られた（図5）。この結果はこれらの遺伝子はあらゆる発生過程の全ての細胞で転写されるが、mRNAは転写後の調節によって予定柄細胞でほとんど蓄積しないことを強く示唆している。このうちタンパク質伸長因子（EF2）は予定柄細胞中にもタンパク質としては存在が認められており、予定柄細胞に分化する以前に合成されたタンパク質が残存していると考えられる。一方、予定柄細胞に特異的な遺伝子Dt100、Dt114、Dt11は後者のサブグループに含まれる。これらの遺伝子は発生過程の特定の時期より転写を開始するが、両予定細胞において転写量にほとんど差は認められない（図4，図5）。しかしmRNAが予定柄細胞に偏って存在することから、これらの遺伝子由来のmRNAが予定胞子細胞で速やかに分解される可能性が示唆される。これらの遺伝子の発現に転写後の他の調節機構が関わるとするならば、それらは転写後の調節としてスプライシング、5' キャップ構造の付加・ポリ(A)鎖の付加などのRNAプロセッシング、mRNAの核外への選択的移送、mRNAの選択的な安定化・不安定化などが考えられる。実際、ある種の予定胞子細胞特異的な遺伝子においては、アンチセンスRNAによるmRNAの不安定化によって調節されていることが知られている（Hildebrandt and Nellen, 1992）。これらの遺伝子についていかなる調節機構が働いているかを知ることが次なる課題である。

第4章では、細胞型特異的な転写調節機構を解明することを目的にDp87遺伝子の予定胞子細胞特異的な転写調節に関与するシス領域およびそれに相互作用する核内因子の解析を行なった。Dp87遺伝子は単細胞アメーバが集合して細胞の流れを形成する時期に転写され始め、現在知られている予定胞子細胞特異的な遺伝子の中で最も早く転写を開始する遺伝子である。また、第3章で明らかにした様に、その細胞型および発生過程における発現は主として転写レベルで調節されている。これらのことは、この遺伝子の発現の調節機構を理解することが予定胞子細胞分化の機構を解明する上で非常に重要であることを示している。

この遺伝子の 5' 上流域を 5' 側より順次欠損させてレポーター遺伝子 (CAT 遺伝子) につないだキメラ遺伝子を作製して粘菌細胞に形質導入した予備実験から、-447~-356 の領域に Dp87 遺伝子の転写調節に重要な正の調節領域が存在することが示唆されていた (図 6)。本研究でさらに詳細な解析を行なったところ、Dp87 遺伝子の転写調節領域は以前に同定された領域に加えて以下の様な異なる機能を持つ 4 つの領域からなることが示された。第 1 の領域は転写開始点より上流 -664~-158 に存在し、予定胞子細胞で特異的に働く正の調節領域 (領域 A~D) である。これはさらに領域 A (-666~-433)・B (-432~-350)・C (-349~-232) および D (-231~-158) の 4 つの機能単位に分けられ、予備実験において同定されたシス領域 (-447~-350) はほぼ領域 B に重なる。第 2 に増殖期細胞および予定柄細胞において負の調節を行う領域 (領域 E; -158~-94) が存在し、第 3 として発生段階に関わらず正の調節をおこなう領域 (領域 F; -93~-63)、第 4 として TATA box および転写開始点を含み、領域 A~F、特に領域 E・F が正常に機能するために必要な領域 (領域 G; -62~+8) が見出された。

領域 A・B・C を 5' 側より順次削除すると移動体における転写量が減少した (図 8 A)。また、領域 C のみを削除した遺伝子においては移動体における転写が検出されたのに対し、領域 C に加えさらに領域 D を削除するともはや転写が見られなくなった (図 9 A, 形質転換体 3-2・3-4)。さらに、これらの領域 A~D はいずれかひとつを削除しても予定胞子細胞に特異的な転写のパターンには影響を及ぼさなかった (図 8 C, 図 9 C)。以上のことから、領域 A~D はそれぞれ予定胞子細胞に特異的な転写を引き起こすか、あるいは全ての細胞において正の転写調節を行なうことが示唆される。ここで、負の調節領域 E のみを除いた場合には増殖期に β -gal 活性の上昇が見られたのに対し (図 9, 形質転換体 3-5)、領域 E および転写の効率に関わる領域 F を同時に削除するともはや増殖期における活性の上昇が見られなかった (図 9, 形質転換体 3-7)。もし、領域 A~D が単に転写の効率に関わる調節領域から成り立っているとすると、形質転換体 3-7 においても活性の上昇が見られるはず

であるが、それは認められなかった。さらに、領域A～Dと領域Fとの組み合わせによってアクチン15遺伝子由来のプロモーターに対して予定胞子細胞特異的な転写を引き起こすことが出来た（図11，形質転換体6-2）。これらの結果は、領域A～Dが全ての細胞で正に働く領域ではなく、予定胞子細胞に特異的な正の転写誘導を起こさせるシス領域であることを強く示唆している。

領域A～Dの境界部に10～20bpのDNA断片を挿入した変異遺伝子においては、どこに挿入した場合でも移動体期における β -Gal活性が低下したが、予定胞子細胞に特異的な転写には影響を示さなかった（図9 B・C）。このことは、正の調節領域A～Dが最大限に機能するためにこれらの領域が適当な距離にあることが必要であるが、予定胞子細胞特異的な転写は相対的な位置に関係なく引き起こされることを示唆している。また、形質転換体4-1・4-2における移動体での転写活性が、それぞれ形質転換体1-3、1-4の場合よりも高いことから、各領域間の距離が変わった場合でもそれぞれの領域は有効に機能していると考えられる（図8 A，図9 B）。

この様な複数の正の調節領域の存在は、他の予定胞子細胞特異的な遺伝子においても知られている。例えば、胞子外被タンパク質SP60をコードする遺伝子*cotC*においてCAに富む塩基配列を含む3つの領域CAE1～3が存在している。もっとも、この場合はそれぞれを削除すると予定胞子細胞領域内での発現パターンが変化することから、これらの領域はそれぞれ異なった調節を担っており、それらが協調的に働くことによって予定胞子細胞領域全体としての発現が調節されることが示唆されている。また、SP70をコードする遺伝子*cotB*においても3'側（-346～-108）と、5'側（-1461～-551）の調節領域が、独立に働いていることが示されている（Fosnaugh and Loomis, 1993）。しかし、この場合には、*cotC*遺伝子の場合と異なり、これらのいずれか一方を欠失しても予定胞子細胞領域内での発現パターンが変らないので、これらの領域が機能的には同等であると考えられている。Dp87遺伝子においては、領域A～Dのいずれか一つを削除しても予定胞子細胞領域内における転写のパターンに影響は見られなかった（図8 C，図9 C）。これは、*cotB*遺伝子の場合と同様、

領域A～Dのそれぞれが予定胞子細胞特異的な調節領域として同等な機能を持つことを示唆している。しかしながら、領域AおよびBの両方とも削除しても予定胞子細胞特異的な転写が見られたのに対し、領域CおよびDの両方とも削除するともはや移動体期における転写が見られなくなった（図8，形質転換体1-3；図9，形質転換体3-4）。このことは、領域A～Dは調節領域として全く対等ではなく、領域AとBは必ずしも必要ではないが少なくとも領域CあるいはDのうちどちらかひとつが存在することが転写に必須であることを示唆している。

領域A、B、Dには、それぞれCAに富んだ配列であるCA-box（ACACCCA）が存在する（図7，図16）。CA-boxは、*cotC*遺伝子の転写調節領域CAE-1とCAE-3、また*cotA*遺伝子の転写調節領域および*cotB*遺伝子の転写開始点付近側の転写調節領域にもみられる（図16A；Haberstroh et al., 1989, Tasaka et al., 1992, Fosnaugh and Loomis, 1991）。*cotA*、*cotB*、*cotC*の各遺伝子上の配列については、これらを含む領域のDNA断片に特異的に結合する核タンパク質が報告されている。特に*cotC*遺伝子の場合においてCA-boxに点突然変異を与えると転写が減少し、核タンパク質との結合が阻害されることが明らかにされている（Haberstroh et al., 1991）。Dp87遺伝子においても、*in vitro* DNA結合実験から移動体由来の核抽出液中に領域Bに塩基配列特異的に結合するタンパク質性の核内因子の存在が示された（図12）。領域Bをさらに分割した競合体を用いた実験よりこの因子は特にCA-boxを含む領域B1・B2を認識することが明らかとなった（図13B）。この結合活性は領域A、Dに対しても見られ、さらに*cotA*遺伝子のシス領域と競合することが明らかにされている（図12；Tasaka, 1991）。この様にこれらの予定胞子細胞特異的な遺伝子のシス領域における共通配列（CA-box配列）の存在ならびに*cotA*遺伝子およびDp87遺伝子のシス領域に結合する核内因子の存在は、これらの遺伝子の転写調節に共通の機構が関与していることを示唆している。

領域Cは領域A、B、Dで見られる様なCA-boxを持たず、*in vitro* DNA結合実験においてもこれらの領域に塩基配列特異的に結合する核内因子に対して非常に弱い結

合親和性しか示さなかった（図12C）。これらの領域には*cotC*遺伝子の転写調節領域である3つのCAE配列（CACACAN₃₋₄CACAC）に類似した配列が存在する（図16B；Haberstroh et al., 1991）。*cotC*遺伝子のそれぞれのCAE配列には結合特異性の異なる複数の核内因子が結合することが明らかになっている（Haberstroh et al., 1991）。本研究の予備実験において領域Cに塩基配列特異的に結合する核内因子を検出することが出来なかったが（データは省略）、領域A、B、Dに結合する核内因子とは結合性の異なる因子が存在し、領域A～Dを介した予定胞子細胞特異的な正の転写調節が*cotC*遺伝子の場合と同様に複数種の因子によって行われている可能性も考えられる。

領域Eを削除すると増殖期における転写量が上昇した（図9，形質転換体3-5）。一方、アクチン6遺伝子の転写活性化領域をその上流につなぎ、増殖期の細胞および予定柄細胞における転写活性を上昇させた場合に、これらの細胞において転写を抑制した（図10，形質転換体5-1と5-3との比較）。これらのことから、領域Eは少なくとも増殖期細胞および予定柄細胞において負の転写調節をおこなっていることが示唆される。本研究から領域Eによる負の調節が予定胞子細胞において働いているかどうか明らかにすることは出来なかった。このような負の調節領域の存在は予定胞子細胞に特異的に発現する遺伝子では今までに報告されていない。一方、予定柄細胞の一部である*pstB*細胞特異的に発現する遺伝子*ecmB*において、転写開始点より上流-486～-208の領域が予定柄細胞の一部である*pstA*細胞における転写を抑制していることが報告されている（Ceccarelli et al., 1991）。しかしながら、この領域と領域Eとの塩基配列の類似性は見出されなかった。領域Eを*Dp87*遺伝子の転写開始点付近の領域（領域G）の代わりに、アクチン15遺伝子のプロモーター領域につないだときに、負の調節領域としては機能せず、むしろ正の調節領域の様にふるまった（図11，形質転換体6-1と6-2との比較）。このことは、領域Eが負の調節領域として正常に機能するために領域Gが必要であることを示唆している。

領域F（-93～-63）を削除すると、予定胞子細胞における転写量が著しく減少した（図

9 A, 形質転換体3-6)。一方、アクチン6遺伝子の転写活性化領域をその上流につないだ場合に増殖期の細胞と予定柄細胞において転写活性が増大した(図10 A・C, 形質転換体5-1と5-2との比較)。これらの結果から、領域Fは全ての細胞において転写量を増大させる正の転写調節をおこなっていることが示唆される。また、領域Eと領域Fが共存すると増殖期細胞と予定柄細胞における転写活性が抑制されたことから、領域Eによる負の転写調節は領域Fによる正の転写調節より強く作用することが示唆される(図10 A・C, 形質転換体5-3と5-2との比較)。領域Fは数箇所A塩基で区切られているほかはT塩基が連続した配列であり、細胞性粘菌の遺伝子の転写調節領域でよく見られる様なGCに富んだ配列が存在しない。この様な配列が転写調節に関与する例として、UDPGP1遺伝子の5'上流域に存在する増殖期における転写調節領域が知られている(Pavlovic et al., 1989)。

領域GはTATA-boxと予想される配列及び転写開始点を含む領域である(図7)。この領域の塩基配列は非常にA塩基に富み、粘菌の遺伝子の転写開始点付近に一般的に見られるT-stretchが見られない(Kimmel and Firtel., 1983)。この転写開始点近傍のA塩基に富む配列は、*cotA*、*cotC*、*PsA*などの予定胞子細胞特異的な遺伝子には見られず、むしろ発生初期に発現する遺伝子ALFに認められる(図17; May et al., 1989; Fosnaugh et al., 1991; Tasaka et al., 1992)。このことは、Dp87遺伝子が他の予定胞子細胞特異的な遺伝子より発生の初期に発現することと関係するのかもしれない。

領域Gの代わりにアクチン15遺伝子のプロモーター領域を領域A～Fにつないだときに領域Eによる増殖期における負の調節が見られなかった(図11 A, 形質転換体6-1)。また、領域A～DおよびFをつなぐことで移動体期において予定胞子細胞に特異的な転写を引き起こすことが出来たが、形質転換体3-7で見られた様な移動体期での転写活性の上昇が見られなかった(図9 A, 図11 A・C)。これらの結果は、領域Eによる負の転写調節並びに正の転写調節領域A～DおよびFによる移動体期での転写活性の上昇に領域Gが必要であることを示唆している。また、外来DNAの

挿入によって領域E・F・Gの位置関係を変えると増殖期における領域Eによる負の調節が出来なくなることから、領域Eと領域Gの位置関係も重要であると思われる。一方、細胞外タンパク質をコードする予定胞子細胞特異的な遺伝子PsAにおいて-125より上流の領域をアクチン15遺伝子のプロモーター領域につないだ場合は、Dp87遺伝子の場合と異なり、正常な転写調節が行なわれることが報告されている (Early and Williams, 1989)。このことは、Dp87遺伝子の転写調節機構とPsA遺伝子のそれとは異なることを示唆しており、こうした違いは図17で示したような転写開始点付近の領域の構造の違いを反映している可能性が考えられる。

本研究によってDp87遺伝子の予定胞子細胞特異的な転写調節に機能の異なる複数の調節領域が関与していることが明らかになった。このことはこれらの領域を介して異なる正・負の転写因子がこの遺伝子の転写を調節していることを示唆する。この様に分化した細胞あるいは組織に特異的な遺伝子がさまざまな機能を持った調節領域によって転写調節を受けている例は、一般に動物・植物において広く見られている (Bustos et al., 1991; Hauffe et al., 1993; Jackson et al., 1992; Kamachi and Kondoh, 1993; Leyva et al., 1992)。発生過程における複雑な転写調節や、組織・細胞型に特異的な転写調節を厳密に行なうにはこうした複数種の正・負の調節領域が関与し、微妙に柔軟に調節することが重要なものかもしれない。細胞性粘菌においてもひとつの遺伝子に複数の調節領域が存在する例が数多く報告されているが、その中でDp87遺伝子の様に、発現しない細胞で積極的に転写が抑制される例は、PstB細胞に特異的な*ecmB*遺伝子の場合を除いて、予定胞子細胞特異的な遺伝子においては今まで知られていない。この様な調節様式がDp87遺伝子に特異的なものか、あるいは予定胞子細胞特異的な遺伝子に広く存在するかについては今後さまざまな遺伝子についての詳細な解析によって明らかにされるべき問題である。

A

Dp87 Region A	-510	TCACTCACCCAATTT	-524
Dp87 Region B1	-416	CATTACACCCACAAT	-402
Dp87 Region B2	-396	ATATACACCCTAGAC	-382
Dp87 Region D	-225	ACTAACACCCATTTT	-215
<i>cotA cis</i>	-619	TTAAACACCCAAATT	-605
<i>cotB cis</i>	-347	TTTCTCACCCACACA	-333
<i>cotC CAE1</i>	-598	TCACACACCCACACA	-584
<i>cotC CAE3</i>	-402	ACACACTCCCAACAC	-389
Consensus		ACACCCA	

B

Dp87 Region C	-259	ATCACACACACTTCGCACACTGT	-237
<i>cotC CAE1</i>	-602	TTTTTCACACACCCA_CACACTAT	-581
<i>cotC CAE2</i>	-520	CATTACACATTAA_CACACTTT	-499
<i>cotC CAE3</i>	-407	TCAACACACTCCCAACACACAAG	-386
Consensus		CACACAC N ₃₋₄ CACAC	

図16. Dp87遺伝子および胞子外被タンパク質遺伝子群の転写調節領域に見られる共通配列。(A) CA-box配列。(B) CAE-like配列。共通する配列に陰をつけている。()は塩基配列のギャップを示す。

Dp87 -63 TATTTATTG **AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAT**

cotA -82 AAAACAATAATAATAATAATTTTTTCAAAACAATTCATAA

cotB -83 TTTATTTAATTGTGTATTTTGATTATTGCTCTCTACTTTT

cotC -77 AATAAACATATAATATTTATATAAAATCATAAATTTAAAA

PsA -82 **ATTTTATTTTTTTTTTTTTTATTTTTTTTTTATTATTTTTTTTA**

ALF -190* GATCC **AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAA**

Dp87 -23 TAATAAT **TAAATAAATAAAAAATAAAAAATAAATA** TTTTTTATAAT

cotA -42 TATAAAT TTTATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAATATT

cotB -43 TATATAT TTTTTTTTCAAATTTTATTATTATTTCAATTATTATTAT

cotC -37 TAAATAA TTTTTTTAATATTTAAAAATTCTAATAAAAAGTTTTTT

PsA -42 TATAAAT AGGTCAATTTTTATTATTTATTAATTAATGTTATTATT

ALF -150* TATAAAT **TAAAAATAAAAATATTATTAATAAAAAAAAAAAGGGG**

図17. Dp87遺伝子と他の予定胞子細胞特異的な遺伝子および発生過程初期に発現するALF遺伝子との転写開始点付近の塩基配列の比較。転写開始点(図中傍点)を+1としたときの相対位置を数字で示す。ALF遺伝子については、転写開始点が報告されていないため翻訳開始点を+1とした時の位置を数字の右肩に*を付けて示している。予想されるTATA boxを二重下線で、転写開始点を傍点で示している。A塩基・T塩基に富む領域をそれぞれ白抜き文字・陰をつけて表した。

謝 辞

本研究は、京都大学理学部植物学教室の田坂昌生助教授の御指導のもとで行なわれました。先生には心より感謝申し上げます。また、実際の研究に当たってさまざまな便宜・アドバイスを与えてくださいました京都大学理学部植物学教室の岩淵雅樹教授、岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所の川田健文先生と三上浩司先生並びに同研究所の皆様および千葉県がんセンターの尾崎俊文先生、姫路工業大学の織井秀文先生に深く感謝致します。本論文の執筆にあたって多大な便宜を与えていただいた筑波大学生物科学系の田仲可昌教授と柳沢嘉一郎教授に感謝致します。最後に、基礎生物学研究所において研究する機会を与えていただき、さらに全般のディスカッションにおいて非常に有意義な御意見を与えてくださいました同研究所所長の竹内郁夫先生に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- Barklis, E. and Lodish, H. F. (1983) Regulation of *Dictyostelium discoideum* mRNAs specific for prespore or prestalk cells. *Cell* **32**, 1139-1148.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Breiggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P. and Tjian, R. (1986) Purification and Biochemical Characterization of the promoter-specific teanscription factor, Sp1. *Science* **234**, 47-52.
- Bustos, M. M., Begum, D., Kalkan., F. A., Battraw, M. J. and Hall, T.C. (1991) Positive and negative *cis*-acting DNA domains are required for spatial and temporal regulation of gene expression by a seed storage protein promoter. *EMBO J.* **10**, 1469-1479.
- Ceccarelli, A., McRobbie, S. J., Jermyn, K. A., Early, A. and Williams, J. G. (1987) Structural and functional characterization of a *Dictyostelium* gene encoding a DIF inducible, prestalk-enriched mRNA sequence. *Nucl. Acids Res.* **15**, 7463-7476.
- Ceccarelli, A., Mahbubani, H. and Williams, J. G. (1991) Positively and negatively acting signals regulating stalk cell and anterior-like cell differentiation in *Dictyostelium*. *Cell* **65**, 983-989.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Corney, A. J, Richards, A. J., Phillpots, T. and Hames, B. D. (1990) Developmental regulation of cell-type-enriched mRNAs in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Microbiol.* **4**, 613-623.
- De Lozanne, A. and Spudich, J. A. (1987) Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**, 1086-1091.
- Dingermann, T., Reindl, N., Werner, H., Hildebrandt, M., Nellen, W., Harwood, A.,

- Williams, J. and Nerke, K. (1989) Optimization and in situ detection of *Escherichia coli* β -galactosidase gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* **85**, 353-362.
- Early, A. E. and Williams, J. G. (1989) Identification of sequences regulating the transcription of a *Dictyostelium* gene selectively expressed in prespore cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6473-6484.
- Fosnaugh, K. L. and Loomis, W. F. (1991) Coordinate regulation of the spore coat genes in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Genetics* **12**, 123-132.
- Fosnaugh, K. L. and Loomis, W. F. (1993) Enhancer regions responsible for temporal and cell-type-specific expression of a spore coat gene in *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* **157**, 38-48.
- Groudine, M., Perets, M. and Weintraub, H. (1981) Transcriptional regulation of hemoglobin switching in chicken embryo. *Mol. Cell Biol.* **1**, 281-288.
- Haberstroh, L. and Firtel, R. A. (1990) A spatial gradient of expression of a cAMP-regulated prespore cell-type-specific gene in *Dictyostelium*. *Genes & Dev.* **4**, 596-612.
- Haberstroh, L., Galindo, J. and Firtel, R. A. (1991) Developmental and spatial regulation of a *Dictyostelium* prespore gene: cis-acting elements and a cAMP-induced, developmentally regulated DNA binding activity. *Development* **113**, 947-958.
- Hauffe, K. D., Lee, S. P. Subramaniam, R. and Douglas, C.J. (1993) Combinational interactions between positive and negative cis-acting elements control spatial patterns of *4CL-I* expression in transgenic tobacco. *Plant J.* **4**, 235-253.
- Hildebrandt, M. and Nellen, W. (1992) Differential antisense transcription from the *Dictyostelium* EB4 gene locus: implications on antisense-mediated regulation of mRNA stability. *Cell* **69**, 197-204.
- Howard, P. K., Ahen, K. G. and Firtel, R. A. (1988) Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 2613-2623.
- Jackson, S. M., Keech, C. A., Williamson, D. J. and Guitierrez-Hartmann, A. (1992)

Interaction of basal positive and negative transcription elements controls repression of the proximal rat prolactin promoter in nonpituitary cells. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 2708-2719.

Jacobson, A., Firtel, R. A. and Lodish, H. F. (1974) Synthesis of messenger and ribosomal RNA precursors in isolated nuclei of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* **82**, 213-230.

Jermyn, K. A., Berks, M., Kay, R. R. and Williams, J. G. (1987) Two distinct classes of prestalk-enriched mRNA sequences in *Dictyostelium discoideum*. *Development* **100**, 745-755.

Kamachi K. and Kondoh H. (1993) Overlapping positive and negative regulatory elements determine lens-specific activity of the d1-crystallin enhancer. *Mol. Cell Biol.* **13**, 5206-5215.

Kimmel, A. R. and Firtel, R. A. (1983) Sequence organization in *Dictyostelium*: unique structure at the 5'-ends of protein coding genes. *Nucleic Acids Res.* **11**, 541-552.

Leyva, A., Liang, X., Pinto-Toro, J. A., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1992) *cis*-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell* **3**, 1051-1061.

Loomis, W. F. (1982) The development of *Dictyostelium discoideum*. Academic Press, New York.

Maniatis, T., Goodbourn, S. and Fischer, J. A. (1987) Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* **236**, 1237-1245.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

May, T. Kern, H., Müller-Taubenberger, A. and Nellen, W. (1989) Identification of a *cis*-acting element controlling induction of early gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell Biol.* **9**, 4653-4659.

Mehdy, M. C., Ratner, D. and Firtel, R. A. (1983) Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Cell* **32**, 763-771.

Morrisset, J. H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* **117**, 307-310.

Nellen, W., Silan, C. and Firtel, R. A. (1984) DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2890-2898.

Nellen, W., Silan, C., Saur, U. and Firtel, R. A. (1986) Regulatory sequences in the promoter of the *Dictyostelium* Actin 6 gene. *EMBO J.* **5**, 3367-3372.

Oakley, B. R., Kirsch, D. R. and Morris, N. R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105** 361-363.

Obara, T. and Suzuki, Y. (1988) Temporal and spatial control of silk gene transcription analyzed by nuclear run-on assays. *Dev. Biol.* **127**, 384-391.

Ozaki, T., Hasegawa, M., Hamada, Y., Tasaka, M., Iwabuchi M. and Takeuchi, I. (1988) Molecular cloning of cell-type-specific cDNAs exhibiting new types of developmental regulation in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Differ.* **23**,119-124.

Pavlovic, J., Harubabu, B. and Dottin, R. P. (1989) Identification of a signal transduction response sequence element necessary for induction of a *Dictyostelium discoideum* gene by extracellular cyclic AMP. *Mol. Cell Biol.* **9**, 4660-4669.

Ratner, D. and Borth, W. (1983) Comparison of differentiating *Dictyostelium discoideum* cell types separated by an improved method of density gradient centrifugation. *Exp. Cell Res.* **143**, 1-13.

Romans, P., Firtel, R. A. and Saxe III, C. L. (1985) Gene-specific expression of the actin Multigene family of *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* **186**, 337-355.

Steers Jr., E. and Cuatrecasas, P. (1974) β -galactosidase. In *Methods in Enzymology*, Vol. 34 (Eds. Jacoby, W. B. and Wilchek, M.), pp 350-358, Academic Press, New York.

Sussman, M. (1966) Biochemical and genetic methods in the study of cellular slime mold

development. *Meth. Cell Physiol.*, **2**, 397-410.

Tasaka, M., Toda, K., Nakao, H. and Takeuchi, I. (1988) Developmental regulation of a prestalk- and stalk-enriched protein in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* **39**, 16-21.

Tasaka, M., Hasegawa, M., Ozaki, T., Iwabuchi, M. and Takeuchi, I. (1990) Isolation and characterization of spore coat protein (sp96) gene of *Dictyostelium discoideum*. *Cell differ. Develop.*, **31**, 1-9.

Tasaka, M. (1991) Developmental regulation of expression of prespore-specific gene in *Dictyostelium discoideum*. *Bot. Mag. Tokyo* **104**, 359-370.

Tasaka, M., Hasegawa, M., Nakata, M., Orii, H., Ozaki, T. and Takeuchi, I. (1992) Protein binding and DNase-I hypersensitive sites in the cis-acting regulatory region of the spore-coat SP96 gene of *Dictyostelium*. *Mech. Dev.* **36**, 105-115.

Toda, K., Tasaka, M., Mashima, K., Kohno, K., Uchida, T. and Takeuchi, I. (1989) Structure and expression of elongation factor 2 gene during development of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **264**, 15489-15493.

Treisman, R. and Maniatis, T. (1985) Simian virus 40 enhancer increases number of RNA polymerase II molecules on linked DNA. *Nature* **315**, 72-75.

Watts, D. J. and Ashworth, J. M. (1970) Growth of myxamoebae of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174.

Williams, J. G., Ceccarelli, A., McRobbie, S., Mahbubani, H., Kay, R. R., Early, A., Berks, M. and Jermyn, K. A. (1987) Direct induction of *Dictyostelium* prestalk gene expression by DIF provides evidence that DIF is a morphogen. *Cell* **49**, 185-192.